UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

PH. SENGEL: Analyse expérimentale du développement *in vitro* des germes plumaires de l'embryon de poulet . . . 177

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

G. FODOR, I. VINCZE, and J. TÓTH: The Absolute Configuration of Valeroidine 183
F. L. SCOTT, R. E. GLICK, and S. WINSTEIN: Amido, Ureido and Urethano Neighbouring Group Participation . . . 183
CH. TAMM, G. VOLPP und G. BAUMGARTNER: Beweis des Steringerüstes von Ouabagenin 185
F. KRADOLFER, R. WYLER und R. MEIER: Abhängigkeit der Antiviruswirkung bakterieller Polysaccharide von Behandlungstermin, Behandlungsdosis und Infektionsstärke 187
E. R. REDFEARN: Observations on the Alleged Occurrence of Vitamin A in Baker's Yeast 189
ERIKA LÖHR: Das Verhältnis von Chlorophyll a/b bei vollgedüngten und stickstoffmangelnden Pflanzen 189
J. HLADOVEC, Z. ROUBAL, and V. MANSFELD: Antilipemic Activities of Several new Heparinoids 190
D. M. ROSS: The Action of Tryptamine and 5-Hydroxytryptamine on Muscles of Sea Anemones 192
J. CHURÝ: Der Einfluss der Befruchtung mit Spermagemisch auf die Ribonukleinsäure während der embryonalen Entwicklung der Regenbogenforelle 194
A. SENGÜN: Larvale und imaginale Mitteldarmchromosomen von *Drosophila repleta* 196
R. MEIER und P. DESAULLES: Über die Entwicklung des Fremdkörpergranuloms in verschiedenen Organsystemen 197
J. HANKISS: Gesteigertes Wachstum bei Ratten nach Leberschädigung durch CCl_4 198
T. J. HALEY and J. RUTSCHMANN: Brain Concentrations of LSD–25 (Delysid) after Intracerebral or Intravenous Administration in Conscious Animals 199
B. RYBAK et J. TRÉPEAU: L'asphyxie, moyen d'analyse de l'électrocardiogramme de grenouille 200
L. R. REY: Dispositif pour l'examen microscopique aux basses températures (Pro Laboratorio) 201
H. HUBER und HJ. KOLDER: Bariumtitanat-Druckgeber für Dekompressionsversuche (Pro Laboratorio) 202
L. MACHO and V. LICKO: A Contribution to the Evaluation of the Glucose Tolerance Test (Pro Experimentis) . . 204
R. CIOLA: The Determination of Volatile Aldehydes in Gases and Vapours (Pro Experimentis) 205

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

Studiorum Progressus: A. E. NEEDHAM and P. C. J. BRUNET: The Integumental Pigment of *Asellus* 207
Studiorum Progressus: H. J. HÜBENER: Über den Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone 210
Congressus 216

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1° des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;

2° de *brèves communications*;

3° informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse und Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni, come* pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPÒRIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

E X P E R.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 75 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: 1/1 page Fr. 220.–, ½ page Fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S. A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 19
Adresse télégraphique: Edita Bâle

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di f. 44.– per la Svizzera; all'estero fr. 56.–. I prezzi vanno intesi svizzera.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fasciolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 75 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in piu e della copertina viene indivato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estrati vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: ½ pag. fr. 220.–. ½ pag. fr. 132.–, ¼ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

Casa editrice Birkhäuser S. A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 19
Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Algerien, Belgien, Dänemark, Finnland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–, (DM 56.–).
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 75 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: ½ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19
Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA is published on the 15 of every month and can be obtained in any country through booksellers or from the publishers. The annual subscription price by inland mail is fr. 44.–; other countries fr. 56.–. Prices in Swiss currency. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before the publication.
The authors receive, on request, 75 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.
Prices for advertising: ½ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertissements should be sent to the publishers.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 19
Telegrams: Edita Basel

Printed in Switzerland / Birkhäuser AG. Basel

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers– Experientia XIII/5

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
S. Karger, Basel
L. Light & Co., Hamburg
Lonza AG., Basel
Sandoz AG., Basel
Schwitter AG., Basel
N. Zivy & Cie. SA., Basel

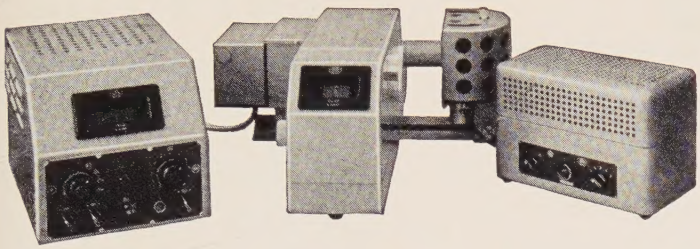
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 cm^3 Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*

LONZA

Calcium-Carbid

Metall-Legierungen: Ferrosilicium. Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin), Ferrosilicium-Mangan.

Silicium-Metall (Reinsilicium)

Silicium-Carbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie «Lonsicar» als Betonhartstoff. **Graphit.**

Stickstoff- und Komplex-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Volldünger, Composto Lonza.

Kunststoffe: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Mischpolymerisate, Polyvinylalkohol

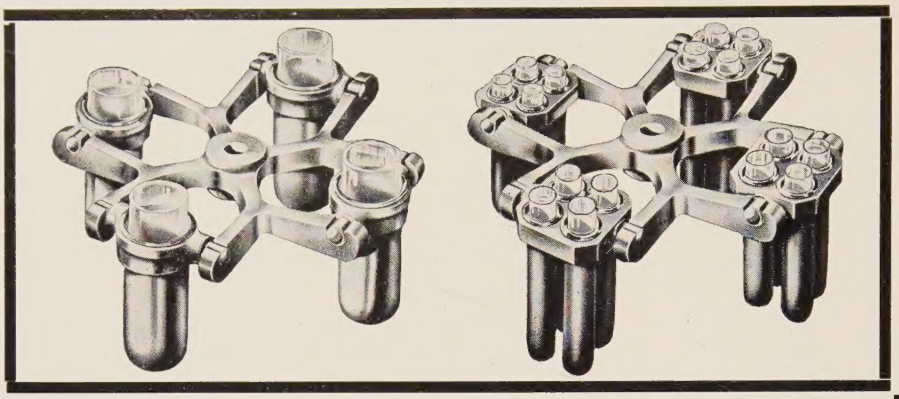
Weitere chemische Produkte

Acetaldehyd
Acetessiganilid
Acetessigäthylester
Acetessigmethylester
Aethylacetat
Ammoniak
Ammonnitrat
Anilin
Butylalkohol
Crotonaldehyd
Dicyandiamid
Essigsäure
Essigsäureanhydrid
Formaldehyd
Harnstoff
Methylacetat
Methylalkohol
Natriumacetat
Natriumnitrat
Natriumnitrit
Nitriersäure
Nitrobenzol
Paraldehyd
Salpetersäure
Spezialösungsmittel
Vinylacetat monomer

ELEKTRIZITÄTS-WERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN A.G. BASEL

*

WISSENSCHAFTLICHE GERÄTE



Für jede Aufgabe die passende

MSE

ZENTRIFUGE

Generalvertreter:

N. ZIVY & Cie S.A.

Über 21 Modelle

mit standardisierten, untereinander auswechselbaren Ausschwing- und Winkelköpfen (von 4 × 1000 ml bis 128 × 15 ml).
Mannigfacher Zubehör, grosse Leistung, robust und preiswert.

MSE-Zentrifugen: Ein Maximum an Annehmlichkeit!

Basel, Spalenring 164, Telephon (061) 22 97 86

FÜR LABORATORIUM UND BETRIEB

L. LIGHT & CO., GMBH.
Hamburg-Altona, Stahltwiete 11

Forschungschemikalien

ein Auszug aus unserer *ersten* Liste

Acetyl-thiocholinjodid	22.– G
L-Arginin monohydrochlorid	11.– G
3,4-Benzpyren (krebserregend)	35.– G
Bilirubin	35.– G
Biliverdin	95.– G
Curcumin, krist.	6.– G
DL-Cysteinhydrochlorid	80.– G
Cytosin	40.– G
Diphenyl-picryl hydrazyl	16.– G
D-Erythrose	18.– G
γ-D-Glucoheptose	16.– G
Haemin	9.– G
Harmalin hydrochlorid	58.– G
Indoxylacetat	24.– G
Lithocholinsäure	26.– D
3-O-Methyl-D-glucopyranose	8.– G
Naphthidin	40.– G
L-Norleucin	18.– G
5-Oxy-Indolyl-Essigsäure	15.– A
D-Raffinose	30.– H
Serotonin creatininsulfat	20.– d
D-Tagatose	25.– G
DL-iso-Zitronensäurelacton	25.– G

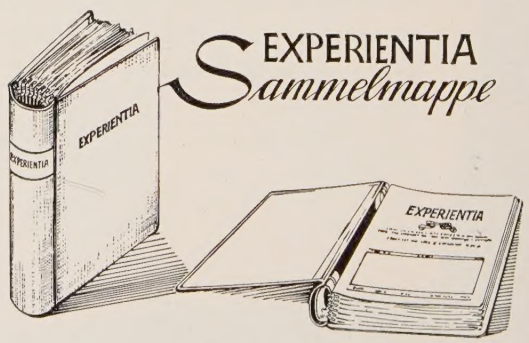
Alle diese und 600 andere organische Präparate stehen Ihnen *ab Lager* zur Verfügung. Verlangen Sie Listen für sich und Ihre Kollegen.

Usine de Suisse romande
cherche

CHIMISTES DE RECHERCHES

pour travaux d'identifications, d'analyses structurales et de synthèses, sous la direction d'un chimiste très connu.

Quelques années d'entraînement post-doctorat désirables. Ecrire sous chiffre L 3977 X à Publicitas, Genève.



EXPERIENTIA *Sammelmappe*

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL (SCHWEIZ)

EXPERIENTIA

Vol. XIII - Fasc. 5 Pag. 177–216 15. V. 1957

Analyse expérimentale du développement *in vitro* des germes plumaires de l'embryon de poulet

Par Ph. Sengel*

A. *Introduction et position du problème*

La morphogénèse d'un organe embryonnaire est souvent le résultat de la collaboration intime de deux composants distincts d'une même ébauche. Si l'on vient à priver une telle ébauche de l'un de ses constituants, celle-ci est incapable de se développer normalement. Le problème est de définir le rôle de chacun des éléments de l'ébauche et de déterminer, pour chacun d'eux, la part qu'il prend dans l'édification de l'organe.

Un tel problème se pose au sujet de la formation des germes plumaires de l'embryon de poulet. Dans leur ensemble, ces germes plumaires constituent le duvet embryonnaire. Ils apparaissent chez l'embryon au cours du 7e jour d'incubation. La première indication de leur développement est visible dès le début du 7e jour, sous la forme de petites taches rondes et opaques, tranchant nettement dans la peau translucide (Holmes[1]). L'histologie révèle qu'il s'agit de condensations locales des cellules dermiques, au niveau desquelles l'épiderme subit un léger épaississement nettement circonscrit. Nous convenons d'appeler ces petites taches les *ébauches plumaires dermiques*.

Dans la région dorso-lombaire de l'embryon, elles apparaissent d'abord sur la ligne médio-dorsale, pour gagner ensuite graduellement les régions dorso-latérales et les flancs (Holmes[1], Gerber[2]). Elles sont toujours alignées, en direction céphalo-caudale, d'une manière sensiblement parallèle à la ligne médiane dorsale. De plus, elles sont toujours disposées en quinconce et approximativement équidistantes les unes des autres. Jusqu'à la fin du 7e jour d'incubation, les ébauches dermiques ne s'accompagnent d'aucune excroissance notable de l'épiderme et la peau reste à peu près lisse. A ce stade, les rangées d'ébauches sont en général au nombre de 5 ou de 7.

A l'âge de 7 jours, les premiers *germes plumaires* commencent à pousser, sur la ligne médio-dorsale d'abord; ensuite, latéralement de part et d'autre de la première rangée apparue. A 8 jours, les germes plumaires les plus avancés ont pris la forme de petites excroissances hémisphériques qui hérissent la surface de la peau. Ils sont alors composés d'un capuchon ectodermique, l'épiderme, rempli par les cellules du derme constituant son axe mésodermique. A cours du développement ultérieur, les germes plumaires continueront à s'allonger considérablement jusqu'au stade de la différenciation de la papille dermique et des crêtes barbaires.

Des expériences de Cairns et Saunders[3] montrent que l'élément mésodermique de la peau de l'embryon de poulet est responsable de la différenciation du caractère régional de la plume, mais elles ne démontrent pas le rôle du mésoderme de la peau dans l'édification du germe plumaire.

Le présent travail se limite à l'étude du développement précoce du germe plumaire, qui se décompose en deux phases successives: la première correspond à la concentration des cellules du derme aboutissant à la formation des ébauches plumaires dermiques; la seconde est caractérisée par la poussée des germes plumaires.

Quels sont les facteurs déterminant la différenciation des ébauches dermiques? Quels sont les rôles du derme et de l'épiderme dans le développement du germe plumaire?

B. *Matériel et méthodes*

Toutes les expériences sont faites sur des fragments de peau d'embryons de poulet de la race Leghorn blanc. L'âge des embryons, au moment du prélèvement de la peau, varie, selon les séries expérimentales, de 6 à 8 jours d'incubation.

Les fragments de peau (2,0 × 1,5 mm environ) sont prélevés dans la région dorsale de l'embryon. Ils sont toujours découpés de part et d'autre de la ligne médiane dorsale, une paire dans la région lombaire et, éventuellement, une autre paire dans la région thoracique. L'un des fragments de chaque paire sert de témoin.

* Laboratoire d'Embryologie expérimentale du Collège de France, Paris.

[1] A. Holmes, Amer. J. Anat. *56*, 513 (1935).

[2] A. Gerber, Rev. suisse Zool. *46*, 161 (1939).

[3] J. M. Cairns et J. W. Saunders, Jr., J. exp. Zool. *127*, 221 (1954).

Comme de nombreux auteurs (MOSCONA[4], TRINKAUS[5], ZWILLING[6], GROBSTEIN[7]) l'ont fait en face de problèmes analogues, nous avons utilisé les propriétés protéolytiques de la trypsine pour séparer le derme de l'épiderme. Tout en nous inspirant des techniques mises au point par certains de ces auteurs, nous les avons modifiées de manière à conserver intact le mésenchyme dermique, tout en obtenant une séparation parfaite des deux constituants de la peau. Des expériences de contrôle ont montré que les explants ne souffrent pas de leur passage dans la solution de trypsine. Leur comportement *in vitro* ne s'en trouve pas modifié et la croissance des germes plumaires s'effectue normalement.

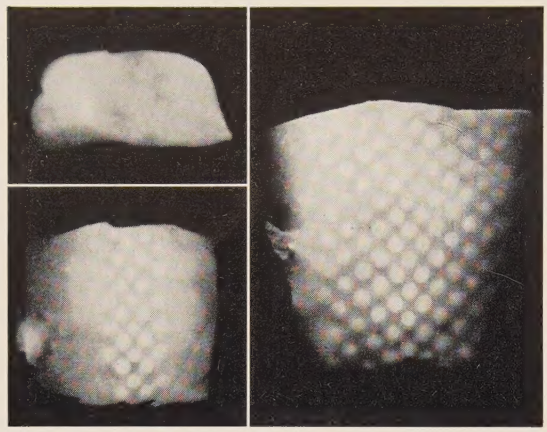


Fig. 1. Fragments de peau de la région dorso-lombaire prélevés et fixés (Bouin-Hollande) aux stades 0, 1 et 2. Grossissement: × 8. *a* Stade 0: noter l'absence d'ébauches plumaires. *b* Stade 1: deux rangées d'ébauches plumaires dermiques de chaque côté de la rangée médio-dorsale; l'épiderme est encore plat et indifférencié. *c* Stade 2: cinq rangées d'ébauches plumaires dermiques de chaque côté de la rangée médio-dorsale; noter le relief des jeunes germes plumaires des sept rangées centrales.

L'âge des fragments de peau est défini grossièrement par la durée d'incubation de l'embryon sur lequel ils sont prélevés. Mais l'examen attentif de la peau permet de distinguer trois stades précis de la différenciation des fragments:

1° *Stade indifférencié ou stade 0:* durée d'incubation inférieure à 6½ jours. Le derme est optiquement homogène; l'épiderme est plat (Fig. 1*a*).

2° *Stade des ébauches dermiques ou stade 1:* durée d'incubation comprise entre 6½ et 7 jours. Chaque fragment de peau présente 1,2 ou 3 rangées d'ébauches dermiques; l'épiderme est plat (Fig. 1*b*).

3° *Stade des jeunes germes plumaires ou stade 2:* durée d'incubation comprise entre 7¼ et 7¾ jours. Chaque fragment de peau présente au moins 4 rangées d'ébauches dermiques qui commencent à s'exhausser; l'épiderme différencié compte autant de petits germes de 0,02 mm que le derme comporte d'ébauches (Fig. 1*c*).

[4] A. MOSCONA, Exp. Cell. Res. *3*, 535 (1952); Proc. Soc. exp. Biol. Med. *92*, 410 (1956).

[5] J. P. TRINKAUS et P. W. GROVES, Proc. Nat. Acad. Sci. *41*, 787 (1955).

[6] E. ZWILLING, J. exp. Zool. *128*, 423 (1955); *132*, 157, 173, 219, 241 (1956).

[7] C. GROBSTEIN, J. exp. Zool. *130*, 319 (1955); Exp. Cell Res. *10*, 424 (1956).

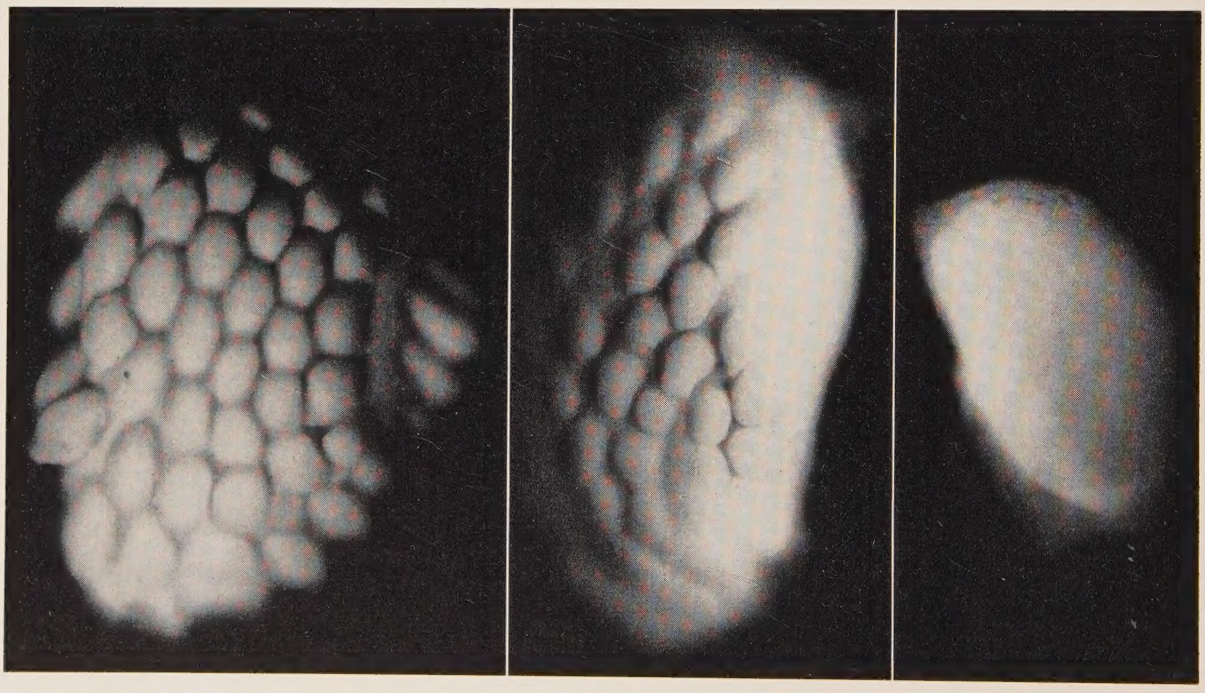


Fig. 2. Fragments de peau fixés (Bouin-Hollande) et photographiés après 5 jours de culture. Grossissement: × 50. *a* Fragment prélevé au stade 0 (E_0/D_0). *b* Fragment prélevé au stade 1 (E_1/D_1). *c* Fragment prélevé au stade 2 (E_2/D_2).

Les fragments de peau sont cultivés *in vitro* pendant 5 jours selon la méthode de culture d'organes de Wolff et Haffen[8]. Le milieu, à base d'extrait embryonnaire de poulet, est celui défini par ces auteurs sous le nom de «standard».

C. *Résultats*

1° *Différenciation in vitro de fragments de peau prélevés à différents stades.* Les fragments de peau en culture évoluent différemment selon qu'ils ont atteint, au moment de l'explantation, l'un des trois stades qui viennent d'être définis.

a) Explanté au stade 0, le fragment de peau ne se différencie pas (Fig. 2*a*). Son épiderme s'étrécit considérablement jusqu'à ne plus occuper qu'une faible partie de la surface de derme. Le derme, au contraire, a tendance à s'étaler et à proliférer d'une manière désordonnée à la surface du milieu. L'unité organique de l'explant s'en trouve détruite.

(*b*) Les ébauches plumaires dermiques, visibles dans des fragments de peau explantés au stade 1, disparaissent complètement au bout de quelques heures de culture. Le derme redevient optiquement homogène. Il faut attendre de 24 à 48 h pour voir réapparaître d'autres ébauches, dont la disposition n'est plus celle du début. Elles sont encore alignées en direction céphalocaudale, mais d'une manière moins rigoureuse. Elles ne sont plus équidistantes les unes des autres. De plus, le côté interne du fragment de peau, pourtant le plus avancé dans sa différenciation au départ, n'est pas le premier à former des ébauches et des germes. Il se produit un complet remaniement des éléments du derme qui amène la première rangée d'ébauches à se différencier sensiblement au milieu de l'explant (Fig. 2*b*). Les rangées suivantes se dessinent progressivement de part et d'autre de la nouvelle rangée médiane. Après 3 jours environ de culture, les germes plumaires commencent leur excroissance et atteignent 0,2 à 0,3 mm en fin de culture.

c) Les fragments de peau plus âgés, de stade 2, ne subissent plus ce remaniement dermique. Les germes plumaires dont la croissance est amorcée poursuivent leur développement. Les ébauches se transforment graduellement en germes plumaires. Dans ce cas, la disposition primitive des ébauches est respectée, et, dans la grande majorité des cas, c'est la rangée située du côté interne de l'explant qui est la plus avancée (Fig. 2*c*). Un fragment de peau de ce stade acquiert des germes qui dépassent facilement 0,4 mm après 5 jours de culture.

d) Le derme et l'épiderme, séparés à la trypsine et cultivés isolément, ne sont pas capables de se différencier, quel que soit le stade de leur prélèvement. Le fragment de derme s'aplatit, ses bords se dissocient et s'effritent. Le fragment d'épiderme se pelotonne, ses cellules se désagrègent et se nécrosent.

Fig. 3. Schéma de l'évolution *in vitro* d'un fragment de peau de stade 0 explanté sur un fragment de tube neural (P_0/TN).

2° *Différenciation in vitro des ébauches plumaires dermiques de la peau associée à d'autres organes.* On vient de voir qu'un fragment de peau de stade 0, non différencié, n'est pas capable, lorsqu'il est explanté seul sur le milieu standard, de franchir le seuil de sa différenciation et de poursuivre ainsi son développement normal. Il semble donc que les facteurs déterminant la formation des ébauches dermiques ne se trouvent ni dans la peau à ce stade, ni dans le jus d'embryon du milieu de culture. Ces facteurs peuvent-ils être fournis par d'autres organes que l'on associerait en culture au fragment de peau ? Pour répondre à cette question, on réalise une sorte de culture au «2e degré» (Wolff[9]) : le fragment de peau est déposé sur un fragment de tube neural, lui-même explanté sur le milieu standard (Fig. 3).

Fig. 4. Fragment de peau de stade 0 explanté sur un fragment de tube neural (selon le schéma de la Fig. 3) fixé (Bouin-Hollande) après 5 jours de culture. Grossissement: × 45.

25 associations de peau de stade 0 et de tube neural, âgé de 5½ et 7¼ jours d'incubation (P_0/TN) ont été explantées. 3 associations se sont dissociées après 24 h de culture, la peau ayant glissé et perdu le contact

[8] Et. Wolff et K. Haffen, J. exp. Zool. *119*, 381 (1952); Texas Reports Biol. Med. *10*, 463 (1952).

[9] Et. Wolff, Bruxelles Méd. *36*, 2235 (1956).

avec le tube neural; ces 3 fragments ne se sont pas différenciés. Des germes plumaires se sont développés dans les 22 associations restantes (Fig. 4). Le nombre moyen des germes est de 6 environ, la taille moyenne de 0,17 mm. Les 25 témoins controlatéraux ont conservé un derme parfaitement homogène; il ne reste pratiquement rien de leur épiderme qui s'est contracté à l'extrême. Il convient de remarquer que le nombre des germes plumaires qui se développent dans les associations de peau et de tube neural est très petit (6 en moyenne) par rapport au nombre de germes qu'aurait donné la même surface de peau chez l'embryon. En effet, le territoire de peau explanté correspond environ à 60 futurs germes. Cette réduction du nombre des germes peut s'expliquer par l'importante contraction que subissent tous les explants. Toutefois, dans les associations, le rétrécissement de l'épiderme, quoiqu'assez important, est loin d'atteindre les proportions qu'il prend chez les témoins.

Fig. 5. Schéma de l'évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1 (E_0/D_1).

D'autres organes embryonnaires – foie, poumon, mésonéphros, muscles – ont donné les mêmes résultats que le tube neural. Dès lors, on pouvait se demander si la croissance des germes plumaires n'était pas due au simple fait d'explanter la peau sur un substrat convexe, alors que les témoins sont sur un milieu plat, en d'autres termes, si le rôle de ces organes ne pouvait se ramener à une banale action physique. Pour éprouver cette hypothèse, 8 fragments de peau de stade 0 sont explantés sur un coussin de gélose nutritive, de même composition que le milieu standard et mimant la forme d'un fragment de tube neural. 8 autres fragments sont cultivés sur un milieu standard fortement bombé. Les 16 témoins controlatéraux sont répartis en 2 lots de 8, l'un est explanté sur des milieux plats, l'autre sur des fragments de tube neural. Les résultats infirment l'hypothèse formulée: aucun des 16 fragments déposés sur coussin de gélose ou sur milieu bombé n'a poussé de germes plumaires; seuls les 8 fragments du lot cultivé en association avec le tube neural ont développé des germes.

Le rôle du substrat organique doit donc être de nature chimique. La question se pose de savoir si l'organe associé apporte à la peau des éléments nutritifs nécessaires à la formation des germes plumaires, ou s'il est le siège d'une activité inductrice de la différenciation des ébauches dermiques. Des expériences ultérieures tenteront de répondre à cette question.

3° *Différenciation in vitro des germes plumaires.* Il suffit, au moment de l'explantation, que la différenciation des germes plumaires soit amorcée, que les premières ébauches soient visibles dans le derme, pour que la peau poursuive, *in vitro*, son évolution normale. Quelle est la part que prend alors chacun des deux constituants de la peau, derme et épiderme, dans l'édification du duvet embryonnaire? Cette question peut être abordée par la culture de «chimères hétérochroniques»: associations, d'une part, d'un fragment de derme différencié (stades 1 et 2) avec un fragment d'épiderme indifférencié (stade 0), d'autre part, d'un fragment de derme indifférencié (stade 0) avec un fragment d'épiderme différencié (stade 2). Deux témoins accompagnent chaque association: le témoin controlatéral du fragment donneur de derme, et celui du fragment donneur d'épiderme. On est ainsi renseigné sur les potentialités propres de chacun des deux composants de l'accociation.

a) I^re série: Association d'épiderme indifférencié (E_0) et de derme au stade des ébauches dermiques (D_1): E_0/D_1 (Fig. 5).

Sur 12 associations E_0/D_1 cultivées pendant 5 jours, 11 se sont développées et ont acquis un nombre moyen de 4,5 germes plumaires par explant. La taille moyenne des germes est de 0,30 mm (Fig. 6). 11 témoins E_1/D_1 ont poussé des germes sensiblement de la même taille, mais en nombre plus élevé (Fig. 2*b*). Les 12 témoins E_0/D_0 ont subi le sort commun à tous les explants de stade 0 (Fig. 2*a*): ni ébauche, ni germe, mais très forte contraction de l'épiderme.

Fig. 6. Association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1 (selon le schéma de la Fig. 5) fixée (Bouin-Hollande) après 5 jours de culture. Grossissement: × 50.

Notons que l'évolution des associations du type E_0/D_1 est en tous points parallèle à celle des fragments de peau entière de stade 1. On observe la même disparition des ébauches au bout de quelques heures de culture, puis le même regroupement des ébauches au centre de l'explant, à partir du 3^e jour de culture. Il y a donc ici encore un complet remaniement des éléments dermiques.

Ces explantations mettent en évidence le rôle actif du derme. C'est sans conteste lui qui donne la première impulsion à l'excroissance des germes plumaires. L'épiderme indifférencié de stade 0, normalement inactif, est capable de répondre à ce qu'on peut appeler l'*induction dermique*. Quelle est la durée de cette induction ? S'exerce-t-elle pendant toute la croissance des germes plumaires ?

Fig. 7. Schéma de l'évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 2 (E_0/D_2).

b) 2e *série: associations d'épiderme indifférencié* (E_0) *et de derme au stade des jeunes germes plumaires* (D_2): E_0/D_2 (Fig. 7).

Les résultats des associations de ce type répondent aux questions qui viennent d'être posées. Il convient de préciser que les fragments de derme de stade 2 possèdent des ébauches qui, pour la plupart, ont déjà la forme de petites excroissances atteignant 0,05 mm. En réalité, il s'agit déjà de l'axe mésodermique de très jeunes germes. Au bout de 5 jours de culture, dans 8 associations E_0/D_2 sur 10, l'épiderme greffé est resté plat, les ébauches dermiques sont restées visibles jusqu'à la fin de la culture (Fig. 8). Leur état est demeuré stationnaire et elles n'ont pas donné naissance à des germes plumaires. Les 2 associations restantes se sont différenciées et ont poussé des germes. Dans ces 2 cas, les ébauches, présentes dans le derme au moment de l'explantation, ont disparu après les premières 24 h, comme cela s'est produit dans la série précédente. Tous les témoins E_2/D_2 se sont développés normalement en acquérant de nombreux germes dont les tailles se groupent autour de 0,38 mm (Fig. 2*c*). Les témoins E_0/D_0, sans exception, sont restés à l'état indifférencié (Fig. 2*a*).

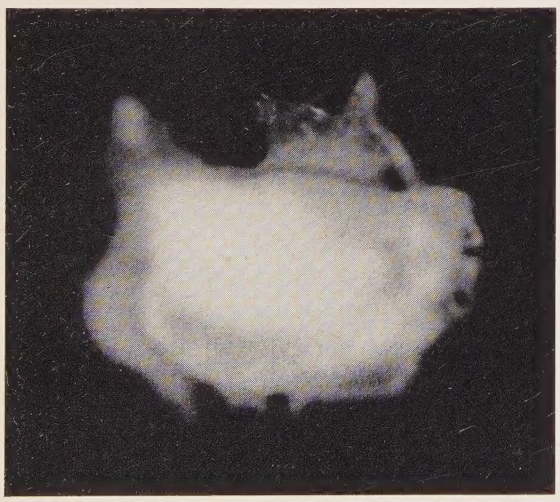


Fig. 8. Association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 2 (selon le schéma de la Fig. 7) fixée (Bouin-Hollande) après 5 jours de culture. Grossissement: × 50.

Fig. 9. Schéma de l'évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 2 et de derme de stade 0 (E_2/D_0).

Il semble donc que, dès le stade des jeunes germes plumaires, le derme ait perdu son pouvoir inducteur et soit redevenu inactif. Il est intéressant de noter que la phase d'activité du derme correspond aux stades précoces de sa différenciation. L'ébauche dermique conserve son pouvoir organisateur tant que la concentration de ses cellules est réversible. Le derme perd ce pouvoir dès que les ébauches, commençant à croître, se fixent définitivement pour se transformer en germes plumaires. Le rôle du derme, dans la différenciation précoce des germes plumaires, se limite à une brève action inductrice sur l'épiderme, contemporaine de l'apparition des ébauches plumaires.

S'il en est ainsi, la tâche d'organiser la croissance des germes à partir de leurs ébauches revient-elle à l'épiderme ? Peut-on montrer que l'épiderme différencié est capable, à son tour, d'induire dans le derme la formation de germes plumaires ?

c) 3e *série: associations d'épiderme différencié* (E_2) *et de derme indifférencié* (D_0): E_2/D_0 (Fig. 9).

Les expériences d'associations du type E_2/D_0 démontrent le rôle organisateur de l'épiderme différencié. Ce dernier est caractérisé par la présence, sur sa face externe, de 4, 5 ou 6 rangées de petites éminences hémisphériques alignées en direction céphalo-caudale. Ces faibles convexités correspondent chacune à la gaine épidermique d'un très jeune germe plumaire qui vient d'amorcer sa croissance. Sur 10 associations E_2/D_0, 8 se sont différenciées et ont acquis, au bout de 5 jours de culture, des germes plumaires bien formés (Fig. 10).

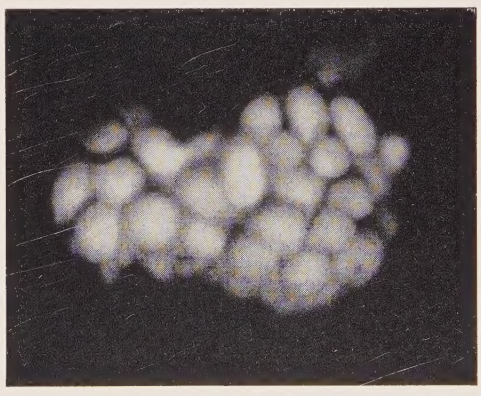


Fig. 10. Association d'épiderme de stade 2 et de derme de stade 0 (selon le schéma de la Fig. 9) fixée (Bouin-Hollande) après 5 jours de culture. Grossissement: × 50.

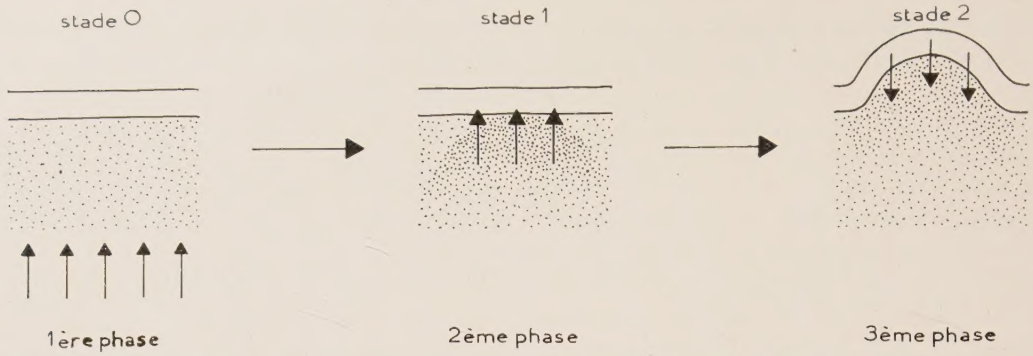


Fig. 11. Schéma des trois inductions successives (matérialisées par les petites flèches parallèles) qui aboutissent à la formation du germe plumaire.

Leur taille moyenne est sensiblement la même que celle des germes qui ont poussé chez les témoins E_2/D_2 (Fig. 2*c*). Leur nombre, au contraire, bien qu'assez élevé dans certains cas, reste nettement inférieur à celui des germes des témoins E_2/D_2. L'une des associations E_2/D_0 n'a donné naissance qu'à 2 germes très petits et mal formés. Une autre ne s'est pas différenciée du tout; mais dans ce dernier cas, le témoin E_2/D_2, lui aussi, est resté plat sans acquérir de germes plumaires. 9 témoins E_0/D_0 sur 10 ne se sont pas différenciés (Fig. 2*a*). 1 témoin E_0/D_0, ayant vraisemblablement quelque peu dépassé le stade 0, au moment de l'explantation, s'est faiblement développé en donnant naissance à 2 germes de 0,02 mm. Néanmoins, l'action de l'épiderme est certaine dans l'association hétérochronique correspondante qui s'est couverte de 20 germes de 0,20 mm et a ainsi atteint un développement que ne lui permettait pas la seule influence dermique.

Il n'est donc pas douteux que l'épiderme joue, dans cette phase du développement, le rôle principal dans l'édification des germes plumaires. Ces derniers se développent à l'emplacement même des petites excroissances épidermiques du stade de départ. Ce sont donc bien ces très jeunes germes qui, en s'allongeant, induisent le derme à suivre le mouvement. Il est remarquable qu'un derme précoce, n'ayant pas formé d'ébauches plumaires, soit capable de répondre à l'action de l'épiderme et de garnir de ses jeunes cellules la gaine épidermique qui s'agrandit. Sous l'influence de l'épiderme, le derme est amené à se différencier bien avant le stade normal de sa différenciation.

D. *Conclusions*

Ces expériences mettent en évidence trois phases d'induction successives qui se placent entre la fin du 6e jour et le milieu du 8e jour d'incubation.

1re phase: elle aboutit, aux environs de 6¼ jours d'incubation, à la concentration des cellules dermiques en petits amas qui constituent les *ébauches plumaires dermiques*. L'inducteur normal de cette transformation du derme n'a pas été localisé. Les résultats montrent qu'il n'a pas son siège dans la peau et qu'un certain nombre d'organes, le tube neural, en particulier, peut jouer le rôle d'inducteur des ébauches dermiques. Il ne semble donc pas qu'il s'agisse d'un inducteur spécifique. Les expériences tendent à prouver, au contraire, que le derme est capable de réagir, selon sa destinée normale, à un agent banal émanant des organes associés. Il n'est pas exclu qu'il en soit de même dans le développement normal de la peau: certaines substances seraient élaborées dans l'ensemble des tissus situés sous la peau et atteindraient, à un certain stade, le derme. Ce dernier répondrait à cette stimulation externe par la formation de ses ébauches (Fig. 11, 1re phase).

2e phase: dès qu'elle a subi la stimulation dont il vient d'être question, la peau se suffit à elle-même et poursuit en culture son développement normal sans l'intervention de facteurs extérieurs. Des expériences antérieures (SENGEL[10]) ont en effet montré que la peau continue sa différenciation *in vitro* sur un milieu constitué uniquement d'une solution physiologique glucosée. Au début du 7e jour d'incubation, l'élément mésodermique de la peau, le seul différencié à ce stade, entre en activité (Fig. 11, 2e phase). Chaque ébauche dermique est un centre d'induction qui agit sur l'épiderme sus-jacent, encore indifférencié. Sous cette influence, l'épiderme s'épaissit au-dessus de chaque ébauche et commence son excroissance. Dès cet instant, les deux éléments du jeune germe sont formés – axe dermique et gaine épidermique – et le derme perd son pouvoir d'induction.

3e phase: dans cette dernière phase, l'épiderme a acquis le pouvoir inducteur perdu par le derme. Il dirige, dès lors, l'excroissance du germe (Fig. 11, 3e phase). La gaine épidermique détermine les cellules dermiques à constituer l'axe mésodermique du germe qui s'allonge.

Zusammenfassung

Die Differenzierung der Dunen des Hühnerembryos lässt drei Phasen erkennen: 1. Eine der Haut fremde Anregung löst im Corium die Bildung der Dunenanlagen aus; 2. diese Dunenanlagen üben eine kurzfristige induzierende Wirkung aus, die die Epidermis zur Ausbuchtung der Dunen veranlasst; 3. die auswachsende Dunenepidermis kommt dann selber zur Induktionsaktivität und bewirkt das Eindringen der Coriumzellen in den in die Länge wachsenden Epidermiszylinder.

[10] PH. SENGEL, C. r. Soc. Biol. *149*, 1032 (1955).

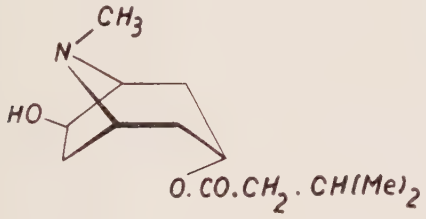
Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

The Absolute Configuration of Valeroidine

The relative configurations[1] of the Tropa alkaloids, with the exception of dioscorine, as well as the absolute configuration of cocaine[2], have been determined, while the correlation of (–) valeroidine—obtained recently by total synthesis[3] also—with any of the optically active series still needs support. HUDSON's lactone rule[4] has been adopted to answer this question.

(+) Tropan-3α · 6β-diol 6-phenylurethane[5] has been resolved by means of D-tartric acid[3] and converted by thermolysis into the antipodes of 3α · 6β-dihydroxy-tropane[6]. The *laevo-rotatory* form, i.e. the alkamine of natural valeroidine, gave with ethyl iodoacetate (–) N_b-ethoxy-carbonylmethyl-3α·6β-dihydroxy-tropanium iodide[7] (m.p. 154° $[\alpha]_D^{20} = -23{\cdot}7°$. Found: C, 38·6; H, 6·2; N, 3·6; J, 34·85. $C_{12}H_{22}O_4NJ$ requires C, 38·9; H, 5·9; N, 3·8; J, 34·25%) which could be cyclized spontaneously into the *dextro-rotatory* lactone of N_b-carboxymethyl-3α·6β- dihydroxytropanium iodide (m.p. 264° [corr., dec.], $[\alpha]_D^{20} = +37{\cdot}5°$. Found: C, 37·4; H, 5·3; N, 4·3; J, 38·9. $C_{10}H_{17}O_3NJ$ requires C, 36·9; H, 5·0; N, 4·3; J, 39·0%).



According to HUDSON's rule, which has been extended to δ-lactones[8]—and provided it holds true for *aza*-lactones also— one may conclude that the asymmetric, hydroxyl-bearing carbon no. 6 concerned belongs to the D-series. Since the free hydroxy acid cannot be isolated as it occurs often[9], owing to its extreme tendency to lactonise, optical rotation of the ethyl *ester* salt has been compared with that of the lactone salt. Making use of the conventions outlined by CAHN, INGOLD, and PRELOG[10], valeroidine may be given the nomination of (3 *R*: 6 *S*) 3α·6β-dihydroxy-tropane-3-monoiso-valeroate. Configurational correlation of (–) valeroidine with either D or L 3-oxo-proline is already in progress to provide conclusive evidence for the structure which has been assigned to this alkaloid.

G. FODOR, I. VINCZE, and J. TÓTH

Institute of Organic Chemistry, the University, Szeged (Hungary), January 23, 1957.

Zusammenfassung

Auf Grund der Laktonregel von HUDSON konnte dem (–) 3α·6β-Dihydroxy-tropan und (–) Valeroidin eine absolute Konfiguration zugeschrieben werden.

[1] Summarized by G. FODOR, Exper. *11*, 129 (1955).

[2] E. HARDEGGER and E. OTT, Helv. chim. Acta *38*, 312 (1955).

[3] I. VINCZE, J. TÓTH, and G. FODOR, J. chem. Soc. *1957*, 1349.

[4] C. S. HUDSON, J. Amer. chem. Soc. *32*, 338 (1910). – P. A. LEVENE and H. S. SIMMES, J. biol. Chem. *68*, 737 (1926). – The same rule has been adopted recently to γ- and δ-hydroxyamino acids, e.g. δ-hydroxy-L-lysine by B. WITKOP. The manuscript of this paper, prior to being published in Exper. *12*, 372 (1956), has been kindly submitted to one of us (G. F.).

[5] G. FODOR, J. TÓTH, I. KOCZOR, and I. VINCZE, Chem. and Ind. *1955*, 1260.

[6] For direct resolution of 3α · 6β-tropandiol see G. FODOR and L. MÉSZÁROS, Research, London *5*, 534 (1952). – G. FODOR and Ö. KOVÁCS, J. chem. Soc. *1953*, 2341.

[7] For stereochemical notations of tropanes see G. FODOR, J. TÓTH, and I. VINCZE, J. chem. Soc. *1955*, 304.

[8] P. A. LEVENE and H. S. SIMMES, J. biol. Chem. *68*, 737 (1926). - The same rule has been adopted recently to γ- and δ-hydroxyamino acids, e.g. δ-hydroxy-L-lysine by B. WITKOP. The manuscript of this paper, prior to being published in Exper. *12*, 372 (1956), has been kindly submitted to one of us (G. F.).

[9] W. KLYNE, Chem. and Ind. *1954*, 1198.

[10] R. S. CAHN, C. K. INGOLD, and V. PRELOG, Exper. *12*, 81 (1956).

Amido, Ureido and Urethano Neighbouring Group Participation

Substituted amide groups[1] provide powerful anchimeric[2] assistance to ionization. For example, benzamidoethyl *p*-toluenesulfonate (I) ionizes to oxazolinium salt in absolute ethanol at 25·0° with a first order rate constant[3], k_1, equal to $1{\cdot}35 \times 10^{-4}$ s^{-1}. While the rate is insensitive to sodium acetate, the inclusion of sodium ethoxide in the absolute alcohol gives rise to a much more rapid formation of oxazoline, obeying second order kinetics, the rate constant[4], k_2, being 0·727 s^{-1} $mole^{-1}$ l. Such a base-dependent cyclization mechanism had been previously discussed by WINSTEIN and BOSCHAN[5], and has more recently been demonstrated by HEINE *et al.* for the $N^{\ominus}$-5- and $0^{\ominus}$-5-cyclizations[6] encountered with N-aryl-4-bromobutanamides[7] and N-2-bromoethylbenz-

[1] S. WINSTEIN and R. BOSCHAN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 4669 (1950). – R. E. GLICK, Ph. D. Thesis, U.C.L.A. 1954. – H. W. HEINE, P. LOVE, and J. L. BOVE, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5420 (1955). – H. W. HEINE, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3708 (1956).

[2] S. WINSTEIN, C. R. LINDEGREN, H. MARSHALL, and L. L. INGRAHAM, J. Amer. chem. Soc. *75*, 147 (1953).

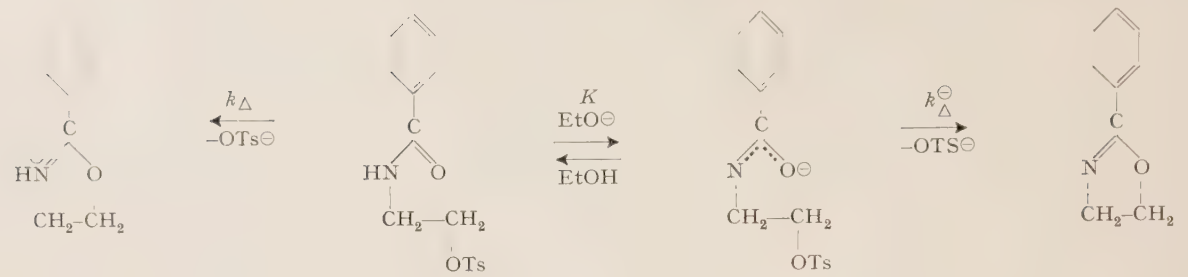
[3] R. E. GLICK, Ph. D. Thesis, U.C.L.A. 1954. – Neopentyl *p*-toluene-sulphonate has a solvolysis rate constant of $1{\cdot}7 \times 10^{-8}$ s^{-1} in ethanol at 75·0°. – S. WINSTEIN and H. MARSHALL, J. Amer. chem. Soc. *74*, 1120 (1952).

[4] R. E. GLICK, Ph. D. Thesis, U.C.L.A. 1954.

[5] S. WINSTEIN and R. BOSCHAN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 4669 (1950).

[6] The symbolism X-*n* is employed, *X* representing the atom of the participating group which closes the ring and *n* denoting the ring size thus obtained. The minus sign in $X_{\ominus}$-*n* is used for the basic mechanism.

[7] H. W. HEINE, P. LOVE, and J. L. BOVE, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5420 (1955).



I II

amides[8]. The observed k_1 is equal to $k_\triangle$, while the observed k_2 is evidently equal to $K\,k_\triangle^\ominus$, where K is the equilibrium constant for the neutralization of the substrate molecule I.

Because of recent interest in this area[9], we are prompted to report in summary form, the results of an investigation of the participation of some neighboring ureido and urethano groups. With the ureido neighboring group both neutral and basic mechanisms were again encountered, the latter being easily made dominant, as can be seen from Table I. With the compounds (IV) examined, we observed 0–5-closure to anilinooxazolines[10] under neutral conditions, and N⊖-5-closure to N-arylimidazolidones[10] in basic solution. With the urethano neighboring group, the duality of mechanism was again evident, the tendency toward the basic mechanism being even more pronounced. Thus, the solvolysis rate of 2-bromoethyl-N-α-naphthylurethane (VI) in 80% ethanol at 75·0° was increased substantially even by sodium acetate, and it was necessary to use a sodium acetate-acetic acid buffer to eliminate the contribution from the basic mechanism. The base-produced N⊖-5-cyclizations of the urethanes V–VII yield N-aryl-oxazolidones, and N⊖-6 cyclizations of X, XI yield N-aryl-oxazinid-2-ones[11]. In addition to the compounds of these types, not previously prepared and so indicated in Table I, both the 3-phenyl- and 3-α-naphthyl-*cis*-4, 5-tetramethylene-oxazolid-2-ones were also obtained in the present work. Under neutral conditions, urethano group participation appears to give 0–5- and 0–6-closure, although the evidence is not unequivocal. Some rates and relative rates of the above processes are summarized in Table I (pag. 185).

Under neutral conditions, the sequence of neighboring groups in the order of decreasing $k_\triangle$ values is benzamido-ureido-urethano-acetoxy, even the last group being powerfully anchimeric[12]. As shown in Table II, the 0–5 ureido closures are accelerated by electron-releasing substituents in the phenyl ring and retarded by electron-attracting groups. It is of interest, also, that with the urethano-substituted bromides, 0–5-cyclization is 20 times as rapid as the corresponding 0–6 change.

The sequence of participating groups in order of decreasing values of k_2 is quite different from the one which obtains under neutral conditions, the differences arising mainly from the varying acidities of the compounds in question. The rate of N⊖-5-cyclization of ureido-substituted bromides is increased by electron-attracting substituents and decreased by electron-releasing substituents in the N-phenyl group (Table II).

Table II. – Effects of Phenyl Substituents on Reaction Rate

Closure Type	*p*-Cl *a*	*p*-NO_2 *a*	*p*-CH_3 *a*	*p*-OC_2H_5 *a*
0–5	0·65 *b*, 0·69 *c*	0·19 *c*	1·15 *c*, *d*	1·30 *c*
0⊖–5	2·00 *b*, *e*	8·00 *b*, *e*	–	–
N–5	0·63 *f*	–	–	1·2 *f*
N⊖–5	3·13 *e*, *f*, 5·18 *g*	87·0 *g*	0·56 *e*, *f*	0·75 *g*

a Rate relative to unsubstituted phenyl derivative; *b* 2-benzamido-1-ethyl-bromide in methanol[8] at 22·9°; *c* 2-phenylureido-1-ethyl bromides (IV) in 80% ethanol at 50°; *d* *o*-tolyl value; *e* Sodium methoxide as base[8]; *f* N-phenyl-4-bromobutanamide in absolute methanol at 22·9°[7]; *g* In absolute ethanol, plus sodium ethoxide, at 25·0°, with substituted (IV).

The effects of some types of methyl substitution on the alkyl portion of the substituted alkyl bromide or toluenesulfonate have been disclosed by the present work. Thus, the effect of 2, 2-dimethyl substitution on rate of reaction of the 3-urethano-1-propyl bromide (X) is qualitatively, not quantitatively like the effect of β-methyl substitution on the usual S_n2 reactions of alkyl bromides with an external nucleophile. With the urethanopropyl bromide, β, β-dimethyl substitution reduces the rate of 0–6-closure by a factor of 75, and that of N⊖-6 by *ca.* 10^3 (Table I). The situation is qualitatively similar in the case of α-methyl substitution in benzamido-ethyl *p*-toluenesulfonate[4] (I). Thus, an α-methyl group reduces the 0–5 rate by a factor of 4 and the 0⊖-5 rate by a factor of 12 in absolute ethanol at 25°. On the other hand, β-methyl substitution increases the 0–5 rate by a factor of 4·5.

It is interesting to note the net balance of electronic, conformational and other steric effects which determine the relative rates of 2-substituted-1-ethyl and *trans*-2-substituted-1-cyclohexyl derivatives. Thus, 2-benzamido-1-ethyl *p*-toluenesulfonate has an 0–5 rate 20 times that of the *trans*-2-benzamidocyclohexyl analog in absolute ethanol[4] at 50°. With the corresponding naphthyl urethano bromides, the ethyl derivative (VI) displays an 0–5 rate *ca.* 10^3 times that of the cyclohexyl derivative in gl. acetic acid at 75°.

Because of the demonstrated large tendency toward participation in substitution processes displayed by such neighboring groups, and the availability of both neutral and basic mechanisms, often permitting a choice of either O- or N-closure, complex amide groups may be

[8] H. W. Heine, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3708 (1956).

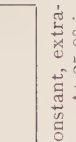
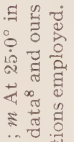
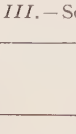
[9] H. W. Heine, P. Love, and J. L. Bove, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5420 (1955). – H. W. Heine, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3708 (1956).

[10] J. P. Picard and A. F. McKay, Can. J. Chem. *31*, 896 (1953).

[11] Compare J. S. Pierce, J. Amer. chem. Soc. *50*, 241 (1928). – R. Adams and J. B. Segue, J. Amer. chem. Soc. *45*, 785 (1923). – J. S. Pierce and R. Adams, J. Amer. chem. Soc. *45*, 790 (1923).

[12] S. Winstein and R. Boschan, J. Amer. chem. Soc. *72*, 4669 (1950). – R. E. Glick, Ph. D. Thesis, U.C.L.A. 1954. – Compare S. Winstein and R. Roberts, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2297 (1953) and references therein.

Table I. – Summary of Rates and Relative Rates

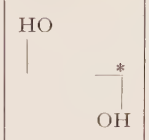
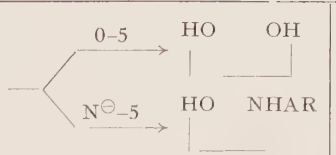
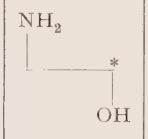
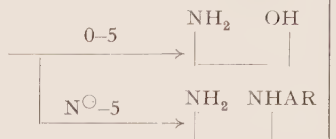
	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
									
$k_1 a \times 10^5$, s^{-1}	111·0 *b, c*	45·4 *d*	9·0	3·36	2·56		0·33 *e*	0·18 *g*	0·0023 *g*
Relative k_1	340	138	25	10	7·5		1	0·5$_4$	0·007
$k_2 \times 10^5$, s^{-1} mole^{-1}l	13,000 *h, j*	1360 *h, k*	5·4 *m, l, o*	ca. $1{\cdot}2 \times 10^6$ *h, l*	$1{\cdot}5 \times 10^5$ *h, l*	0·89 *m, l, o*	–	$> 1 \times 10^5$ *h, l*	30·2 *m*
relative k_2	500	50	6*n*	5×10^4	5×10^3	1 *n*	–	$> 4 \times 10^3$	33 *n*

a At 50·0°, in 80·0% aqueous ethanol; *b* $6{\cdot}88 \times 10^{-5}$ s^{-1} at 25·0°; HEINE[8] reports $2{\cdot}36 \times 10^{-5}$ s^{-1} in absolute methanol at 22·9°; *c* 0–5-closure[13]; *d* 0–5-closure[10]; *e* Drifting rate constant, extrapolated to zero time; *f* 0–5-closure[12]; *g* Calculated from data at higher temperatures; *h* at 25·0° in absolute ethanol with ethoxide ion; *i* O⊖-5-closure[14]; *k* N⊖-5-closure[10]; *l* N⊖-5-closure[11]; *m* At 25·0° in absolute methanol with methoxide ion; *n* Rough relative k_2 value in ethanol, obtained by multiplying k_2 in methanol by 30, this factor being derived from comparison of HEINE's data[8] and ours in the case of 2-benzamido-1-ethyl bromide; *o* These apparent second order constants are somewhat high because of incursion of as much as 1/4 or 1/3 of first order reaction at the concentrations employed.

[13] S. WINSTEIN and R. BOSCHAN, J. Amer. chem. Soc. *72*, 4669 (1950). – R. E. GLICK, Ph. D. Thesis U.C.L.A. 1954. – H. W. HEINE, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3708 (1956).

[14] R. E. GLICK, Ph. D. Thesis, U.C.L.A. 1954. – H. W. HEINE, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3708 (1956).

Table III. – Some Possibilities for Stereospecific Transformations

	Conversion	Participating Group
		Acetoxy[12] / Urethano
		Urethano
		Benzamido[5] / Ureido
		Ureido

important aids in stereospecific transformations. Table III illustrates schematically some of the possibilities, Walden inversion at the starred (*) reaction side being achieved *via* neighboring group participation and hydrolysis of the resultant product.

This work will be published in fuller detail elsewhere.

Acknowledgement. Two of the authors (F. L. SCOTT and R. E. GLICK) are indebted to Eli Lilly and Co. for fellowship grants in support of this work, and one (F.L.S.) is further indebted to the National University of Ireland, for its Travelling Studentship Award.

F. L. SCOTT, R. E. GLICK, and
S. WINSTEIN

Department of Chemistry University of California, Los Angeles, December 7, 1956.

Zusammenfassung

Bei der Ionisation eines 2-substituierten 1-Äthylhalogenides oder -toluolsulfonates mit Beteiligung benachbarter Amidgruppen handelt es sich entweder um eine Ionisation (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_\triangle$) mit Beteiligung der neutralen Amidgruppe, oder um eine Zyklisierung (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $k_\triangle^\ominus$), bei der die anionische Form der Amidgruppe beteiligt ist. Solche Zyklisierungen sind von der Basenkonzentration abhängig; die gemessene Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_2 ist gleich $K\,k_\triangle^\ominus$, wobei K die Gleichgewichtskonstante für die Neutralisation des Substratmoleküls ist. Unter neutralen Bedingungen in 80%igem Äthanol ist die beobachtete Sequenz für $k_\triangle$ Werte für verschiedene benachbarte Gruppen die folgende: Benzamido > Ureido > Urethano > Azetoxy, während in äthanolischer Natriumäthoxyd-Lösung die Sequenz die folgende ist: Urethano > Benzamido > Ureido.

Beweis des Steringerüstes von Ouabagenin[1]

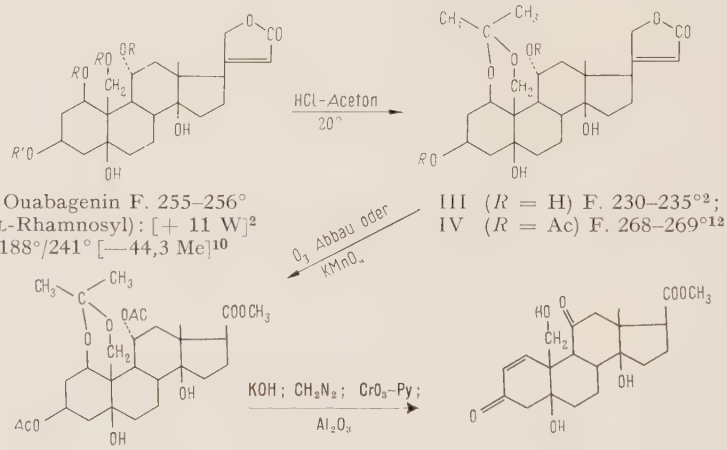
Ouabagenin (I) ist zum ersten Male von MANNICH und SIEWERT[2] aus Ouabain (II) erhalten worden. Es besitzt die Formel $C_{23}H_{34}O_8$ und ist damit das sauerstoffreichste der bisher bekannten Cardenolide. Die Untersuchungen

[1] Glykoside und Aglykone, 178. Mitteilung.

[2] C. MANNICH und G. SIEWERT, Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 737 (1942).

verschiedener Arbeitskreise haben ergeben, dass von den acht Sauerstoffatomen zwei im Butenolidring[3] und eines als tertiäre HO-Gruppe an C–14[4] festgelegt sind. Für die fünf weiteren alkoholischen Hydroxylgruppen, von denen vier acetylierbar sind[5], konnten die Stellungen 1, 3, 5, 11 und 19 gesichert werden[6]. Dabei wurde angenommen, dass Ouabagenin das normale Steringerüst der Cardenolide besitzt. Durch unsere Versuche, über die wir im folgenden kurz berichten möchten, wird der bisher noch ausstehende Beweis für diese Annahme geliefert.

Als Ausgangsmaterial diente das bekannte 1β,19-Isopropyliden-3β,11α-di-O-acetyl-ouabagenin (IV)[7]. Die 1,19-Stellung des Isopropylidenrests ist früher bewiesen worden[8]. Die folgenden Reaktionen erhärten diesen Befund. Sowohl der «Ozon»-Abbau (O_3, Zn-Eisessig, $KHCO_3$ und $NaJO_4$) als auch der Abbau mit $KMnO_4$ in Azeton von IV lieferten vorwiegend saure Anteile. Diese gaben bei der Methylierung mit CH_2N_2 den Ätiansäure-ester V (amorph). Nach sukzessiver Behandlung von V mit KOH, CH_2N_2, CrO_3-Pyridin-Komplex[9] und Al_2O_3-Chromatographie des Rohprodukts wurde der um 1 O-Atom ärmere Ester VI erhalten. Er zeichnet sich durch eine Δ^1-3-Ketongruppierung (UV- und IR-Spektrum) und eine 11-Ketogruppe (Beweise siehe unten) aus. Ring A dieses Esters VI liess sich mit wässrig-methanolischer KOH äusserst leicht (15 min bei 20°) aromatisieren. Es entstanden Formaldehyd (als Dime-

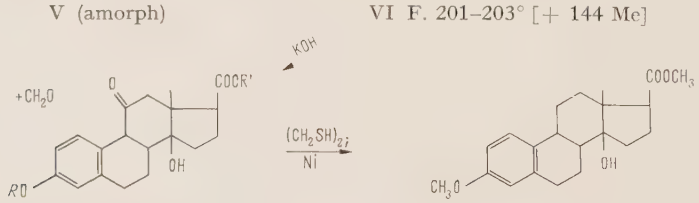


I ($R = R' =$ H): Ouabagenin F. 255–256°
II ($R =$ H; $R' =$ L-Rhamnosyl): [+ 11 W][2]
Ouabain F. 187–188°/241° [—44,3 Me][10]

III ($R =$ H) F. 230–235°[2]; F. 300–305°[11]
IV ($R =$ Ac) F. 268–269°[12] [+ 42,6 Me][13] [+ 72 D][14]

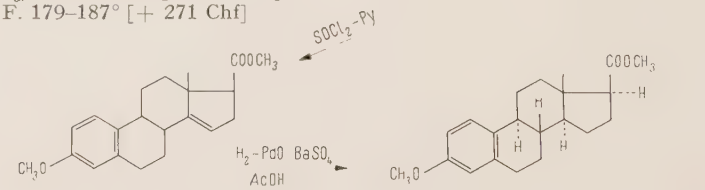
V (amorph)

VI F. 201–203° [+ 144 Me]



VII ($R = R' =$ H) F. 211–229° [+ 240 Me]
VIII ($R =$ H; $R' = CH_3$) F. 250–252° [+ 277 Chf]
IX ($R = R' = CH_3$) F. 179–187° [+ 271 Chf]

X F. 152–155° [+ 97 Chf]



XI F. 167–168,5° [+ 151 Chf]

XII F. 167–168° [+ 99 Chf][15]
F. 166–167° [+ 104 Chf]

Die in eckigen Klammern angegebenen Zahlen sind die spez. Drehungen für Na-Licht. Es bedeutet: Chf = Chloroform, D = Dioxan, Me = Methanol, Py = Pyridin, W = Wasser und Ac = $-COCH_3$.

[3] W. A. Jacobs und N. M. Bigelow, J. biol. Chem. *96*, 647 (1932). – A. Meyrat und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *31*, 2104 (1948). – R. F. Raffauf und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *31*, 2111 (1948).

[4] W. A. Jacobs und N. M. Bigelow, J. biol. Chem. *96*, 647 (1932); *101*, 15 (1933).

[5] A. Meyrat und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *31*, 2104 (1948).

[6] K. Florey und M. Ehrenstein, J. org. Chem. *19*, 1174 (1954). – B. P. A. Sneeden und R. B. Turner, J. Amer. Chem. Soc. *77*, 130 (1955). – Ch. Tamm, Helv. chim. Acta *38*, 147 (1955). – R. Tschesche und G. Snatzke, Chem. Ber. *88*, 1558 (1955). – R. B. Turner und J. A. Meschino, J. Amer. chem. Soc. *78*, 5130 (1956).

[7] C. Mannich und G. Siewert, Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 737 (1942). – R. P. A. Sneeden und R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3510 (1953).

[8] Ch. Tamm, Helv. chim. Acta *38*, 147 (1955).

[9] G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler und L. H. Sarett, J. Amer. chem. Soc. *75*, 422 (1953).

[10] A. Arnaud, C. r. Acad. Sci. *106*, 1011 (1888). – W. A. Jacobs und N. M. Bigelow, J. biol. Chem. *96*, 647 (1932); *101*, 15 (1933). – C. Mannich und G. Siewert, Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 737 (1942).

[11] R. P. A. Sneeden und R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3510 (1953). – Ch. Tamm, Helv. chim. Acta *38*, 147 (1955).

[12] C. Mannich und G. Siewert, Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 737 (1942). – R. P. A. Sneeden und R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3510 (1953). – Ch. Tamm, Helv. chim. Acta *38*, 147 (1955).

[13] R. P. A. Sneeden und R. B. Turner, J. Amer. chem. Soc. *75*, 3510 (1953).

[14] C. Djerassi und R. Ehrlich, J. org. Chem. *19*, 1353 (1954).

[15] C. Djerassi und C. R. Scholz, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3962 (1949).

don-Derivat isoliert) und die phenolische Ketosäure VII (UV-Spektrum, $K_3[Fe(CN)_6]$-$FeCl_3$-Reaktion[16]). Nach kurzer Einwirkung von CH_2N_2 gab VII den phenolischen Ketoester VIII, der nach längerem Stehen mit CH_2N_2 oder bei der Behandlung mit Dimethylsulfat in den Phenoläther IX überging. Die 11-Ketogruppe von IX zeigte gegenüber Ketonreagenzien normale Reaktionsfähigkeit (krist. Oxim). Sie erlaubte dadurch die Bildung eines Thioketals (amorph) mit Äthandithiol, das nach reduktiver Entschwefelung mit *Raney*-Ni den Ester X lieferte (IR-Spektrum). Mit $SOCl_2$-Pyridin wurde aus X der ungesättigte Ester XI (IR-Spektrum) erhalten. Die selektive Absättigung der isolierten Doppelbindung in XI gelang durch Hydrierung mit Hilfe eines PdO-$BaSO_4$-Katalysators nach KUHN und HAAS[17] in Eisessiglösung. Der als Hauptprodukt erhaltene Ester XII war mit 3-Methoxy-17β-carbomethoxy-östra-trien-(1,3,5:10) von DJERASSI und SCHOLZ[18] identisch (Smp., Mischsmp., Spez. Drehung, UV- und IR-Spektrum). Die 17β-ständige Carbomethoxygruppe von X beweist gleichzeitig die 17β-Stellung des ursprünglichen Butenolidrings von Ouabagenin (I)[19].

Damit ist für Ouabagenin die von MANNICH und SIEWERT[2] seinerzeit ohne weitere Begründung vorgeschlagene Formel I endgültig bewiesen.

Einzelheiten dieser Untersuchungen werden später in den Helvetica chimica Acta publiziert werden.

Herrn Prof. T. REICHSTEIN danken wir für das grosse Interesse, das er unserer Arbeit entgegengebracht hat.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» für die gewährte Unterstützung. Ferner dankt der eine von uns (G. V.) der «Hermann-Schlosser-Stiftung», Frankfurt a.M., für ein Stipendium.

CH. TAMM, G. VOLPP und G. BAUMGARTNER

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, den 2. April 1957.

Summary

Ouabagenin (I) has been degraded stepwise to the known 3-methoxy-17β-carbomethoxy-$\Delta^{1,3,5:10}$-estratriene (XII). Thus the presence of a normal steroid skeleton and the β-configuration of the butenolidering at C–17 is proven. The 14β-configuration of the hydroxyl at C–14 was also proven. As a result of these and earlier findings, structure I can be definitely assigned to ouabagenin.

[16] G. M. BARTON, R. S. EVANS und J. A. F. GARDNER, Nature *170*, 249 (1952).

[17] R. KUHN und H. J. HAAS, Angew. Chemie *67*, 785 (1955).

[18] C. DJERASSI und C. R. SCHOLZ, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3962 (1949). – Wir danken Herrn Prof. C. DJERASSI bestens für die Überlassung einer Probe von authentischem 3-Methoxy-17β-carboxy-östra-trien-(1,3,5:10).

[19] Auch die *cis*-Stellung bzw. β-Konfiguration der HO-Gruppe an C–14 haben wir durch die Überführung von Tetra-O-acetyl-ouabagenin in das 1β,3β,11α,19-Tetraacetoxy-5,14-dihydroxy-20-keto-14β-pregnan-21-säure-lacton (21 → 14) bewiesen. (Siehe spätere Mitteilung.)

Abhängigkeit der Antiviruswirkung bakterieller Polysaccharide von Behandlungstermin, Behandlungsdosis und Infektionsstärke

Wirkungsbereich und Wirkungsqualitäten der in unseren Laboratorien untersuchten gereinigten Polysaccharide bakteriellen Ursprungs (MEIER *et al.*[1, 2, 7]) unterscheiden sich in mancher Hinsicht von anderweitig beschriebenen Polysaccharidwirkungen. Bei dem von MEIER und NEIPP[2] erstmals beschriebenen günstigen Effekt der Behandlung der experimentellen Pneumokokkensepsis mit Polysacchariden liegen andere Verhältnisse vor als bei den von anderer Seite mitgeteilten Schutzwirkungen gewisser Lipopolysaccharide gegenüber Infektionen mit gram-negativen Bakterien (LANDY[3] ROSS[4], ROWLEY[5], KISER[6]). Für die mit einem bakteriellen Polysaccharid erzielbare Schutzwirkung an Mäusen gegen die Infektionen mit Col.-SK.-Encephalomyelitis-Virus (MEIER und KRADOLFER[7]) sind die Wirkungsbedingungen wiederum gänzlich verschieden von denjenigen, welche für die Befunde von HORSFALL *et al.* und GINSBERG *et al.*[8] zum Beispiel mit Klebsiella-Kapsel-Antigen gegenüber anderen Virusinfektionen Geltung hatten. Es erschien deshalb angezeigt, die von uns gefundene neuartige Wirkung gegenüber Virusinfektionen in ihrer besonderen Gesetzmässigkeit näher abzuklären.

Für die beschriebenen Versuche wurde folgende Technik angewendet: Der Stamm des Col.-SK.-Encephalomyelitis-Virus war dem früher verwendeten gleich[7]. Mäuse wurden mit 30 ID_{50} virushaltiger Hirnsuspension intraperitoneal infiziert. Unbehandelte Kontrolltiere wiesen zu 100% innert 4–6 Tagen Paralyse einzelner Extremitäten auf und gingen innert weiteren 1–2 Tagen ein. Eine Erholung gelähmter Mäuse haben wir in diesen Versuchen nie beobachten können. Eine Lebensdauer ohne Paralyseerscheinungen von 10 Tagen wurde als *Schutzeffekt*, eine Verkürzung des Intervalls zwischen Infektion und Paralyse bzw. Tod um mehr als 2 Tage als *Aggravationseffekt* ausgelegt.

Bei den Versuchen mit Ektromelie, zu denen ein Virus-Stamm «Brovo» (4. intraplantare Mäusepassage eines spontan aufgetretenen Falles) verwendet wurde, gelangte das Virus in 2 Infektionsstärken zur Anwendung. Je 30 ID_{50} und $^1/_{10}$ dieser Dosis wurde Mäusen intraplantar in den linken Hinterfuss injiziert. Der sich entwickelnde lokale Infektionsprozess kann durch Messungen der Pfotendicke mit geringer Streuung der Werte quantitativ verfolgt werden. Zur Auswertung wurden die täglichen Querschnittswerte im Gruppendurchschnitt vom 5. bis 12. Tag *post infectionem* kumuliert.

Das verwendete, aus *Proteus vulgaris* gewonnene Polysaccharid-Präparat[9], das wirkungsmässig dem frü-

[1] R. MEIER, P. A. DESAULLES und B. SCHÄR, Arch. exp. Path. Pharm. *224*, 104 (1955). – R. MEIER, H. J. BEIN und R. JAQUES, Exper. *12*, 235 (1956).

[2] R. MEIER und L. NEIPP, Schweiz. med. Wschr. *86*, 249 (1956).

[3] M. LANDY, Fed. Proc. *15*, 598 (1956).

[4] O. A. ROSS, N. Y. Acad. Sci. *66*, 274 (1956).

[5] D. ROWLEY, N. Y. Acad. Sci. *66*, 304 (1956).

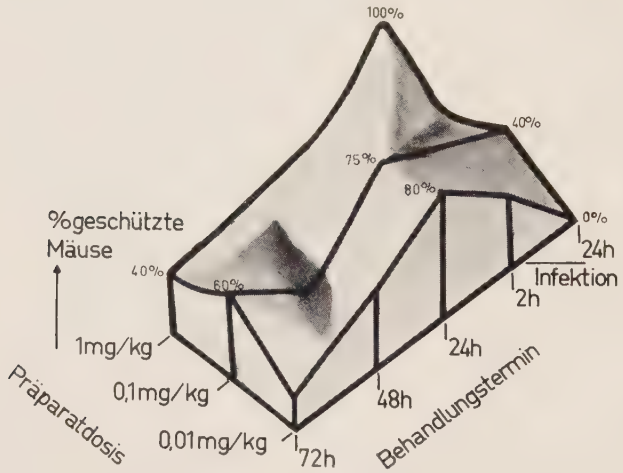
[6] J. S. KISER, H. LINDH und G. C. DE MELLO, N. Y. Acad. Sci. *66*, 312 (1956).

[7] R. MEIER und F. KRADOLFER, Exper. *12*, 213 (1956).

[8] F. L. HORSFALL und M. MCCARTHY, J. exp. Med. *85*, 623 (1947). – H. S. GINSBERG und F. L. HORSFALL, J. exp. Med. *93*, 161 (1951).

[9] Das Präparat wurde in den chemischen Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, von Dr. F. W. KAHNT hergestellt.

her von uns[7] verwendeten Stoffe gleich war, wurde in feinster wässriger Suspension Mäusen in Dosen von je 1, 0,1 und 0,01 mg/kg einmalig intravenös injiziert. Die Behandlung der Mäuse, die von demselben Stamm und derselben Lieferung und im Gewicht von 14 bis 17 g waren, erfolgte 72, 48, 24 oder 2 h vor, bzw. 24 h nach der Infektion. Zu jedem Zeitpunkt und für jede Dosis und Infektionsstärke gelangten 5–6 Mäuse zur Anwendung.



Schutzwirkung der Behandlung mit bakteriellem Polysaccharid in Abhängigkeit von Behandlungstermin und Behandlungsdosis.

Befunde. a) *Effekt gegenüber Col.-SK.-Encephalomyelitis-Virus.* Das in der Abbildung dreidimensional dargestellte Ergebnis eines typischen Versuches mit total 90 Mäusen drückt eine durch die Behandlung der Mäuse mit dem Polysaccharid-Präparat erzielte Schutzwirkung aus. Auffallend ist dabei die starke Abhängigkeit dieses Effektes vom Behandlungstermin und der Behandlungsdosis. An sich ist die Wirkung über einen grossen Dosenbereich von 0,01 bis 1 mg/kg vorhanden, doch besteht für die schwächste Dosis anscheinend die zeitlich engste Begrenzung für eine optimale Wirkung (24 h). Eine Steigerung der Dosis auf 0,1 mg/kg dagegen ergab eine zusätzliche Schutzwirkung bis zu 72 h Vorausbehandlung, und bei weniger als 24 h vor der Infektion erfolgten Polysaccharidgaben trat ein geringerer Wirkungsabfall auf. Ausgesprochen günstige Wirkungsbedingungen wurden bei der Anwendung von 1 mg/kg des Polysaccharids beobachtet, einer Dosis, die relativ sehr hoch ist. Hier ist bei allen gewählten Vorbehandlungsterminen eine Schutzwirkung vorhanden, und in einem Falle (2 h Vorausbehandlung) wurde ein Schutz von 100% erzielt. Die mit dieser hohen Dosis beobachtete zeitliche Verschiebung des Behandlungs-Optimums (von 24 h bis auf 2 h vor der Infektion) konnte auch in anderen Versuchen mit Col.-SK.-Virus und mit Ektromelie beobachtet werden. Der auffallende Abfall der Wirkung bei der 48-h-Vorausbehandlung mit 0,1 mg/kg des Präparates pflegte ebenfalls in anderen Versuchen vorzukommen, besonders deutlich dann, wenn einzelne der Kontrolltiere überlebten. Diese Besonderheit kann bei der quantitativ verfolgbaren, peripheren Ektromelieinfektion noch deutlicher erfasst werden und entspricht, wie im folgenden gezeigt wird, einem Aggravationseffekt der Polysaccharidbehandlung.

b) *Effekt bei der Ektromelie-Infektion.* Die Tabelle gibt das Ergebnis eines typischen Versuches wieder, bei dem wiederum Behandlungstermin, Behandlungsdosis und zusätzlich die Infektionsstärke variiert wurden. Es fällt auf, dass bei den mit 30 ID_{50} infizierten

Hemmung (−) und Förderung (+) der Ektromelieinfektion in Mauspfoten in Abhängigkeit der Polysaccharid-Dosis des Behandlungstermins und der Infektionsstärke.

Dosis des Polysaccharids	Infektionsdosis	Zeitpunkt der Applikation des Polysaccharids Stunden vor und nach der Infektion				
		72 h vor	48 h vor	24 h vor	2 h vor	24 h nach
1 mg/kg	10^{-5} (30 ID_{50})	64 + 57%	41 − 20%	44 − 10%	54 + 23%	25 − 73%
0,1 mg/kg		34 − 43%	30 − 43%	67 + 66%	17 −100%	33 − 46%
0,01 mg/kg		38 − 30%	31 − 57%	25 − 73%	46 − 3%	51 + 13%
1 mg/kg	10^{-6}	17 −100%	22 − 17%	32 +150%	26 + 50%	25 + 33%
0,1 mg/kg		17 −100%	27 + 67%	24 + 17%	28 + 83%	38 + 25%
0,01 mg/kg		23 ± 0%	17 −100%	24 − 17%	35 +200%	26 + 50%

Die Zahlen oben links im Feld geben die Querschnittswerte der Pfotendicke an. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Differenz zwischen Normalpfotendicke (17 mm^2) und Pfotendicke der unbehandelten Infektionskontrollen (47 mm^2 für Infektionsstärke 10^{-5} und 23 mm^2 für Infektionsstärke 10^{-6}).

Gruppen der Schutzeffekt bei der Ektromelie und der SK.-Virusinfektion unter gleichen Bedingungen auftrat. Auch der Wirkungsabfall findet seine Entsprechung bei der Ektromelie nach Behandlungsdosis (0,1 mg/kg) und Vorbehandlungstermin (48 h). Hier und besonders häufig bei der geringeren Infektionsdosis liegt ein Wirkungsumschlag vor, indem die Schwellung der Pfoten früher als bei den unbehandelten Kontrolltieren auftrat und einen höheren Grad erreichte. Die stärksten Aggravationseffekte traten bei der stärkeren Infektion mit steigender Behandlungsdosis zu immer früheren Behandlungsterminen auf und verhielten sich somit genau umgekehrt wie die Maxima des Schutzeffektes (vgl. entsprechend eingerahmte Werte in der Tabelle).

Wesentliches Merkmal dieser Befunde ist die Periodizität von Schutzwirkung und Aggravationseffekt in Abhängigkeit von der Behandlungsart. Es ist naheliegend anzunehmen, dass die Hemmung und Förderung der beiden artifiziellen Virusinfektionen in einem bestimmten Zusammenhang stehen mit einem zeitlichen Aufeinandertreffen bestimmter Infektionsstadien und gewissen Phasen einer Resistenzschwankung. Diesen durch die Behandlung mit dem Polysaccharid geschaffenen Wirkungsbedingungen unterliegen zwei in ihrer systematischen Zugehörigkeit weit auseinanderliegende Virusarten wie das neurotrope Virus der Col.-SK.-Encephalomyelitis und das pantrope Ektromelievirus in weitgehend ähnlicher Weise. Ob noch andere Virusinfektionen in dieser Beziehung gleich reagieren, ist durch weitere Versuche zu zeigen. Die hier mitgeteilten Befunde lassen erkennen, dass die in der Maus durch das von uns verwendete Polysaccharid-Präparat ausgelösten Reaktionen zeitlich, quantitativ und qualitativ von ganz bestimmtem Charakter sind und dass es möglich sein dürfte, eventuell unter Verwendung weiterer Virusarten oder bakterieller Infektionen, die Bedingungen der therapeutischen Wirkung solcher Stoffe genauer zu charakterisieren.

F. Kradolfer, R. Wyler und R. Meier

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, den 21. Februar 1957.

Summary

The paper analyses the protective or aggravating effect of a purified bacterial polysaccharide in Col.-SK.-Encephalomyelitis and infectious ectromelia in mice, as a function of the method of treatment. Both infections are influenced in a largely similar manner with a typical pattern of variation in the host resistance optimal effects depending on characteristic dose/time relations.

Observations on the Alleged Occurrence of Vitamin A in Baker's Yeast

The claim by Ernster, Zetterström, and Lindberg[1] that vitamin A occurs in respiring baker's yeast has recently been refuted[2]. We had also repeated the experiment of Ernster *et al.* and had been unable to demonstrate the presence of vitamin A. The results obtained were similar to those of Heaton, Lowe, and Morton[2].

The aqueous extract of the yeast showed a maximum absorption at a wavelength of 260 mμ but no maximum in the 320–330 mμ region was found. The lipid extract (in ether) showed maxima at 231, 258, 270, and 282 mμ with inflexions at 295 and 325 mμ. Thus the predominant chromogenic material in the lipid extract appears to be ergosterol as already suggested[2]. Negative results for vitamin A were obtained when the $SbCl_3$ colour reaction was used. We found however, that on testing the lipid extract with $SbCl_3$ a red colour (λ_{max} 565 mμ) was obtained immediately on mixing; the colour then changed slowly to give a stable greenish-blue with a maximum at 700 mμ. This blue colour could not be due to carotenoids as there was no absorption in the visible range in the original solution. It seems likely that this result could explain the observations of Ernster *et al.*[1] who based their detection and estimation of vitamin A on a blue colour which, it now seems, was not due to vitamin A.

E. R. Redfearn

Department of Biochemistry, The Queen's University, Belfast (N. Ireland), January 11, 1957.

Résumé

Traité au $SbCl_3$, l'extrait de lipide de levure de boulangerie prend en aérobiose une couleur bleue. Ce résultat n'est pas dû à l'action de la vitamine A ou des caroténoïdes.

Das Verhältnis von Chlorophyll a/b bei vollgedüngten und stickstoffmangelnden Pflanzen

Es hat sich gezeigt, dass ein Mangel an dem einen oder anderen Grundstoff sich nicht nur in deutlich sichtbaren Mangelsymptomen zeigt, sondern dass auch die chemische Zusammensetzung der vollgedüngten Pflanzen im Vergleich zu Mangelpflanzen eine andere ist (Richards[1], Steward und Thompson[2]). Da sich nun Stickstoffmangel unter anderem in geringerer Chlorophyllbildung pro Blattflächeneinheit und einer mehr gelblichen Farbe zeigt, und da Chlorophyll b mehr gelblich ist als Chlorophyll a, lag die Annahme nahe, dass das Verhältnis Chlorophyll a : b bei Mangelpflanzen von dem bei vollgedüngten Pflanzen abweichen würde. Um diese Frage zu lösen, wurden Gerstenblätter von vollgedüngten und von stickstoffmangelnden Pflanzen untersucht.

Methodisches. Die zu den Versuchen benutzten Gerstenpflanzen stammten vom Versuchshof für Pflanzenkultur Virumgaard, Lyngby, 12 km nördlich von Kopenhagen gelegen. Das Versuchsareal, auf dem die stickstoffmangelnden Pflanzen wuchsen, ist seit 1943 nur mit Kunstdünger und zwar mit 200 kg Superphosphat mit 7,9% P und 240 kg KCl mit 41,5% K jährlich pro ha gedüngt worden. Das Areal der vollgedüngten Pflanzen hat jährlich 5000 kg Stalldung, 3000 kg Jauche, 100 kg Superphosphat, 150 kg KCl und 230 kg Kalksalpeter pro ha bekommen. Die benutzte Gerstensorte war *Hordeum distichum nutans forma Ymer.* Sie wurde am 21. April 1956 ausgesät und Blätter davon im Juni für die Versuche – immer das dritte Blatt von oben – ausgenommen. 0,8 g Frischgewicht Blattfläche wurde abgewogen,

[1] L. Ernster, R. Zetterström, and O. Lindberg, Exp. Cell. Res. *1*, 494 (1950).

[2] F. W. Heaton, J. S. Lowe, and R. A. Morton, J. chem. Soc. *1956*, 4094.

[1] F. Richards, 8e Congr. Bot. Paris, Sect. 11, 101 (1954).

[2] F. Steward und J. Thompson, in: H. Neurath und K. Bailey, *The Proteins*, vol. 2, part A (New York 1954), p. 513.

im Mörser mit Sand (pro 100 g reinem Quarzsand 5 g $CaCO_3$) zerrieben, anschliessend mit Äther extrahiert und durch ein Jena-Glasfilter 3G3 filtriert. Die Flüssigkeit wurde im Vakuum eingeengt und quantitativ auf Whatman-Papier Nr. 1 in Streifen aufgetragen und nach der Methode von Bauer[3] modifiziert von Sironval[4], chromatographiert. Als Lösungsmittel kam ein Gemisch von Benzol, Petroläther und Azeton 100:25:20 in Anwendung. Die Chromatogramme wurden aufgeschnitten, die Chlorophylle in je 40 ml Äther über Nacht bei 0° extrahiert und im Beckman-Spektrophotometer gemessen, Chlorophyll a bei 665 mμ und Chlorophyll b bei 645 mμ.

Ergebnisse. Die Totalmenge von Chlorophyll a betrug bei vollernährten bzw. stickstoffmangelnden Gerstenpflanzen pro 100 g Frischgewicht Blattfläche im Durchschnitt:

Chlorophyll a = 252 mg Chlorophyll b = 86 mg	+ N
Chlorophyll a = 170 mg Chlorophyll b = 50 mg	− N

Daraus errechnet sich das Verhältnis von Chlorophyll a/b bei vollernährten Pflanzen zu 2,9 und das von N-mangelnden zu 3,4.

Sagromsky[5] fand, dass K ohne Einfluss auf den Quotienten a/b ist, aber dass N-mangelnde Pflanzen von Chlorella einen etwas höheren Quotienten a/b haben als Normalkulturen. Baumeister und Burghardt[6], die mit Zink arbeiteten, kamen zu dem Resultat, dass Zinkdüngung keinen Einfluss auf das Verhältnis Chlorophyll a/b hat.

Der Quotient Chlorophyll a/b, der von den Beleuchtungsverhältnissen abhängig ist, scheint somit von N-, K- und Zn-Zufuhr nur wenig beeinflussbar zu sein.

Erika Löhr

Pflanzenphysiologisches Laboratorium der Universität Kopenhagen, Dänemark, den 8. Januar 1957.

Summary

The ratio chlorophyll a/b was investigated in leaves from full-manured and nitrogen deficient barley plants. The quotient a/b was 3·2 in nitrogen deficient and 2·9 in full-manured plants.

[3] L. Bauer, Naturwissenschaften *39*, 88 (1952).
[4] C. Sironval, Arch. int. Physiol. *61*, 563 (1953).
[5] H. Sagromsky, Z. Naturf. *11b*, 548 (1956).
[6] W. Baumeister und H. Burghardt, Ber. Bot. Ges. *69*, 161 (1956).

Antilipemic Activities of Several new Heparinoids

The important position of heparin in the problem of atherosclerosis is abundantly documented in a great number of experimental and clinical papers. In the search for new potential substitutes for heparin, we prepared a series of new heparinoids, including a sulphonated ovomucoid, a sulphonated hyalomucoid, a sulphonated amylose undepolymerized and partially depolymerized, a sulphonated saponin and a sulphonated tannin. The antilipemic and anticoagulant activities of these substances were determined in comparison with heparin.

All substances studied were applied subcutaneously in different doses to male rats simultaneously with olive oil, and after 2 h the blood was aspirated from the hear The turbidity of the serum was measured nephelometri cally, total fat was estimated in all dosages and more over total cholesterol was determined in one dosag (15 mg/kg). The same dosage was subjected to pape electrophoresis. Every dose was applied to 5 animals.

The results of these experiments are shown in Figure 1 The levels of cholesterol oscillate irregularly around th mean value. There is a clear evidence of rough correla tion between total fat and the degree of clearing. Th heparinoids can be classed into two groups: (1) sulphon ated ovomucoid, sulphonated hyalomucoid and sulphon ated amylose undepolymerized, all of them substance chemically more closely related to heparin and displayin little antilipemic action; (2) sulphonated amylose de polymerized, sulphonated saponin and sulphonate tannin, evidently substances with little chemical rela tionship to heparin possessing small molecules an relatively high antilipemic activity. The correlation be tween dose and action is evident from the total fat de termination, whilst, as far as the grade of clearing i concerned, the situation is more complicated. Thus it i very difficult to interprete the two-phase response t rising dose in the case of sulphonated saponin.

The anticoagulant activity of the heparinoids was de termined by the modified antithrombin test of Stude and Winterstein[1]. Figure 2 shows a reversed relation ship of activities of the two groups of heparinoids Whereas the first group shows a relatively high anti coagulant activity, the other group, having smalle molecules, reveals a very low one.

The clearing activity *in vitro* was demonstrated wit lipemic rat serum as a substrate. From Figure 3 the sam order of antilipemic activities is quite conceivable whic was demonstrated previously in the experiment carrie out *in vivo*.

Figure 4 represents the results obtained by pape electrophoresis of rat sera after administration of hepa rinoids and olive oil. The lipoproteins were dyed wit Sudan III and the lipidograms were evaluated by elu tion. In every figure the lipemic control is represente by dashed lines and the change following the applicatio of heparinoids by black areas. In the control curves thre peaks are distinguishable. The highest peak is localize near the start and corresponds to β-globulins in the pro teinogram, the middle one corresponds to α-globulin and the fastest peak is located within and before th area of albumin. According to the influence they exer on this pattern, the heparinoids can be classified int three groups. The most similar to heparin is the sulphon ated saponin and the sulphonated ovomucoid. All thre produce only little or no acceleration of migration and very significant relative lowering of the peak near th start in favour of the other two. The sulphonated amy lose and sulphonated tannin show a more conspicuous ac celeration of migration of all three peaks. The sulphonat ed depolymerized amylose exerts, moreover, an especial ly marked depressing influence on total lipoproteins. I the third group, two substances possessing high mole cular weight could be classified: the undepolymerize sulphonated amylose and sulphonated hyalomucoid Even if the acceleration of migration is moderatel marked, the relative change of the peak height is smal

In addition, the acute toxicities were determined o mice. The results are summarized in the Table.

On the basis of comparison of this series of heparinoi substances, it was suggested that the most significan

[1] A. Studer and A. Winterstein, Helv. physiol. Acta *9*, 6 (1951

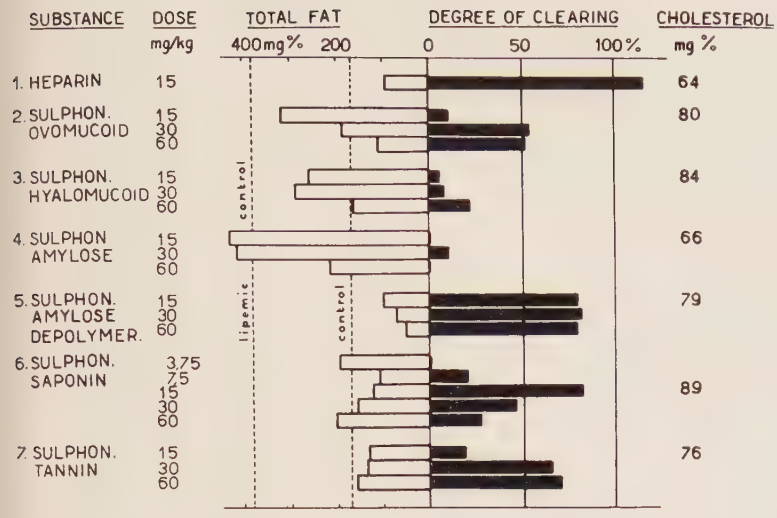

SUBSTANCE
DOSE mg/kg
TOTAL FAT
400mg% 200
DEGREE OF CLEARING
0 50 100%
CHOLESTEROL mg %
1. HEPARIN 15 64
2. SULPHON. OVOMUCOID 15 30 60 80
3. SULPHON. HYALOMUCOID 15 30 60 84
4. SULPHON AMYLOSE 15 30 60 66
5. SULPHON. AMYLOSE DEPOLYMER. 15 30 60 79
6. SULPHON. SAPONIN 3.75 7.5 15 30 60 89
7. SULPHON. TANNIN 15 30 60 76
control
lipemic
control

Fig. 1. — Antilipemic activity of a series of heparinoids in comparison with heparin as revealed by the degree of clearing and lowering of total fat in rat serum.

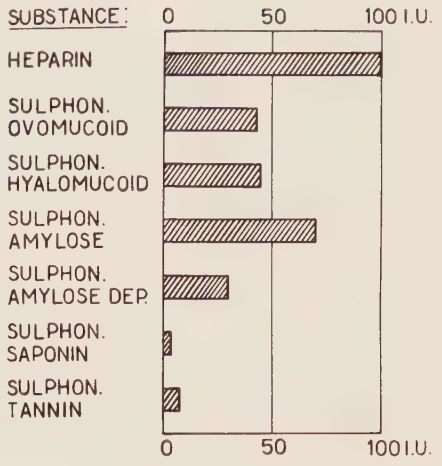


Fig. 2. — Anticoagulant activity of a series of heparinoids in comparison with heparin in the antithrombin test *in vitro*.

Substance	LD 50 mg/kg	Confidence limits
sulph. ovomucoid	600	408–880
sulph. saponin	410	205–820
sulph. tannin	330	206–528
sulph. hyalomucoid	175	83–367
sulph. amylose depolymerized	31	19–51
sulph. amylose undepolymerized	17	10–31

antilipemic activity is shown by substances possessing a relatively low molecular weight. Besides the partially depolymerized amylose which has high toxicity, sulphonated tannin and sulphonated saponin deserve special attention. Furthermore, both substances possess a weak anticoagulant activity and both, notably sulphonated saponin, produce similar changes in the lipoprotein pattern as heparin. Our observations constitute further support for the evidence of non-specifity of the antilipemic action, and its dissociation from anticoagulant action furnishes support for the evidence of high activity of substances with low molecular weight. Moreover, the acceleration of electrophoretic migration and relative change in concentration of lipoprotein fractions can be influenced independently by various heparinoids.

J. Hladovec, Z. Roubal, and V. Mansfeld

Pharmaceutical and Biochemical Research Institute, Prague (Czechoslovakia), December 18, 1956.

Zusammenfassung

Antilipämische und blutgerinnungshemmende Wirkungen einer Gruppe halbsynthetischer Heparinoide wurden *in vivo* und *in vitro* bestimmt. Sulfoniertes Saponin und sulfoniertes Tannin wiesen eine bedeutende antilipämische und eine schwache blutgerinnungshemmende Aktivität auf. Diese Stoffe beeinflussten auch die Elektrophorese der Lipoproteine in ähnlicher Weise wie Heparin.

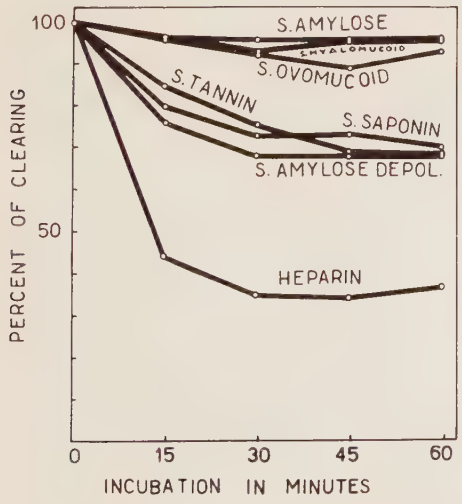


Fig. 3. — Antilipemic activities of heparinoids *in vitro* in comparison with heparin.

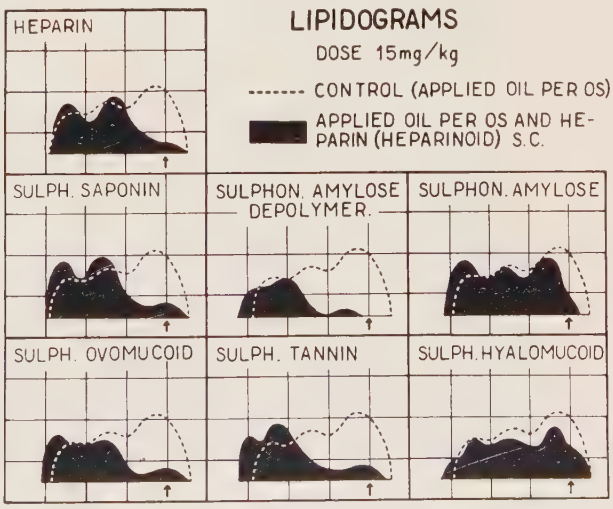


Fig. 4. — Lipidograms of rat sera after the application of heparinoids in comparison with heparin.

The Action of Tryptamine and 5-Hydroxytryptamine on Muscles of Sea Anemones

Neuromuscular transmission in sea anemones has been investigated so far only by studying the action of ions, drugs and extracts on the quick closing response of the whole animals, *Calliactis parasitica* and *Metridium senile*[1]. It is now possible, using isolated preparations[2], to conduct experiments separately on 'quick' and 'slow' muscles. Preparations containing 'slow' muscles, e.g., circular muscles of the column, are continuously active; they respond to electrical stimuli by smooth contractions with long latent periods of 0·5 to 2 min[3]. Preparations containing 'quick' muscles, e.g. sphincters of *Calliactis* or *Metridium*, show little spontaneous activity; to electrical stimuli they give the facilitated response described by Pantin[4] in which, after an ineffective first stimulus, quick step-like movements occur, with latent periods of about 0·10 s, on the second and subsequent stimuli in the frequency range 0·2 to 3·0 s (17°C), the height of the steps depending on the frequency of stimulation. 'Quick' preparations also give typical slow responses to stimuli at lower frequencies[2], a fact that adds interest to the problem of neuromuscular transmission in this case.

In a preliminary survey of the effects of treatments o preparations from *Calliactis* and *Metridium*, the indo alkylamines, tryptamine and 5-hydroxytryptamin (5-HT), gave interesting results. These are reporte here briefly in view of the current interest in this clas of substances, and especially in 5-HT because of it powerful neuromuscular action, its widespread occu rence and its possible neurohumoural function in som invertebrates (Erspamer[5], Welsh[6]).

Unlike smooth muscle from mammalian uterus, in testine or arteries, where 5-HT is 100 to 1000 time more active than tryptamine[5], anemone preparation are more sensitive to tryptamine than to 5-HT. Un treated relaxed preparations of *Metridium* colum ('slow') undergo gentle rhythmical changes of lengt every 10–15 min; tryptamine (1×10^{-4}) causes thi preparation to shorten, usually by stages, until it is a most completely contracted (Fig. 1). Untreated prepara tions of *Calliactis* sphincter ('quick') show almost n spontaneous activity and do not respond to singl stimuli; after tryptamine (1×10^{-4}) the preparatio becomes very active, giving quick contractions every fe minutes (Fig. 2) and in about half the experiments re sponding consistently to single stimuli (Fig. 2). Bot these effects could be due to a facilitating action by th drug which would allow single impulses of electrical o natural origin to cause responses. However, other ex planations based on the possibility of supernumerary o adventitious impulses cannot be excluded. Unlik

[1] D. M. Ross and C. F. A. Pantin, J. exp. Biol. *17*, 61 (1940). – D. M. Ross, J. exp. Biol. *22*, 21, 32 (1945); *29*, 235 (1952).

[2] E. J. Batham and C. F. A. Pantin, J. exp. Biol. *31*, 84 (1954). – D. M. Ross, J. exp. Biol. (in press).

[3] E. J. Batham and C. F. A. Pantin, J. exp. Biol. *31*, 84 (1954).

[4] C. F. A. Pantin, J. exp. Biol. *12*, 119.

[5] V. Erspamer, Pharmacol. Rev. *6*, 425 (1954).

[6] J. H. Welsh, J. Mar. Biol. Ass. U. K. *35*, 193 (1956).

Fig. 1. – *Metridium* circular muscle preparation treated with tryptamine hydrochloride (1×10^{-4}) for 31 min. Arrows indicate beginning and end of treatment. Time signal 10 min.

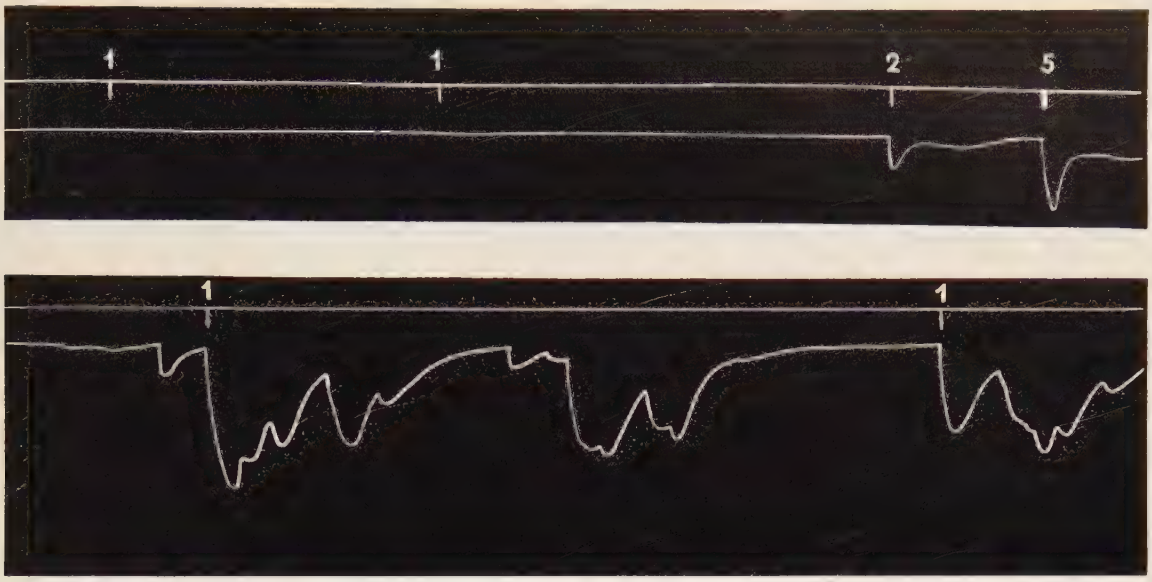


Fig. 2. — Records of *Calliactis* sphincter preparation of 15 min duration (*a*) before treatment and (*b*) from 10–25 min after introduction of tryptamine hydrochloride (1×10^{-4}). Single stimuli given at signals marked '1' in control and treatment; 2 and 5 stimuli (frequency 1·2 s) given at signals marked '2' and '5' in control.

tryptamine, 5-HT (serotonin creatinine phosphate [Roche] 1×10^{-4}) has no direct effects on *Metridium* circular muscle and rarely causes quick contractions of the sphincter preparations.

Lower doses of both tryptamine and 5-HT enhance the quick and slow responses in preparations of *Calliactis* sphincter and shorten the latent period of the slow response (Fig. 3). This suggests that tryptamine acts on some fundamental part of the mechanism of the response and not through superficial sensory effects.

The full interpretation of these results must await the outcome of further tests with other substances. Acetylcholine (and its associates), histamine, noradrenaline and many other substances are quite ineffective, but tyramine, Ca^{++} and possibly adrenaline have limited effects on some preparations which may prove

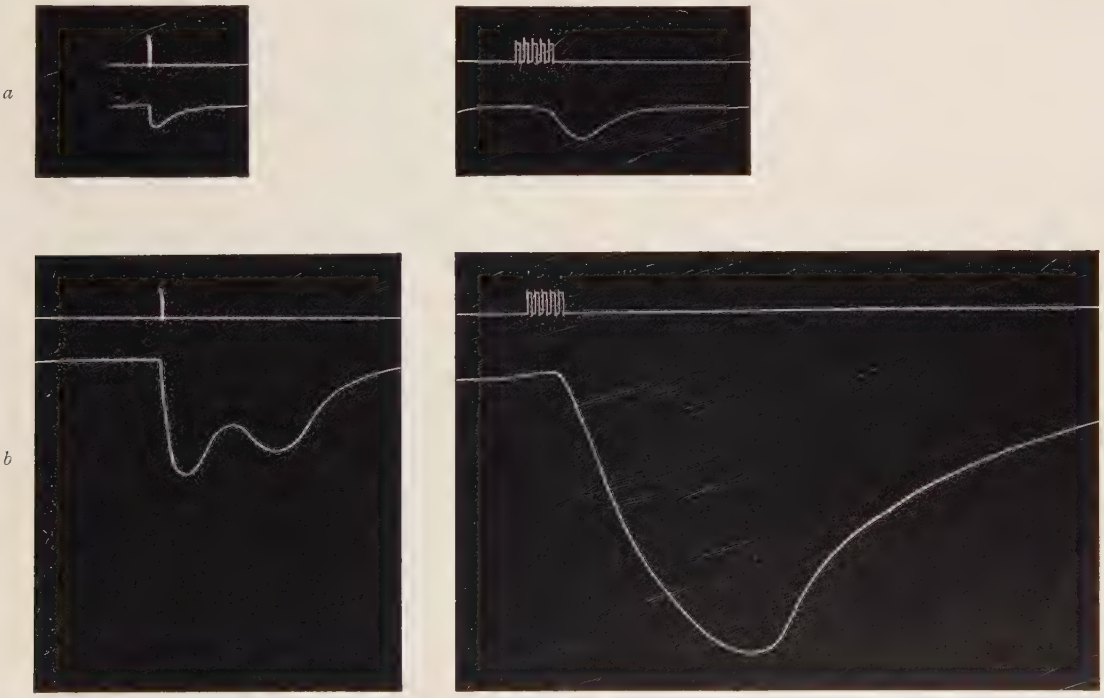


Fig. 3. — Quick response of *Calliactis* sphincter preparation to 2 stimuli at frequency of 1 per s (left side) and slow response of same preparation to 5 stimuli at frequency of 1 per 9 s (right side) (*a*) before treatment and (*b*) 100 and 173 min after the introduction of tryptamine hydrochloride (1×10^{-5}).

to have an important bearing on the problem. However, no substance tested so far matches the many-sided action of tryptamine described above.

D. M. Ross

Department of Zoology, University College, London, January 22, 1957.

Zusammenfassung

Es wird über pharmakologische Versuche mit Tryptamin an den Sphinctermuskeln und den ringförmigen Muskeln der Seeanemonen *Calliactis parasitica* und *Metridium senile* berichtet.

Der Einfluss der Befruchtung mit Spermagemisch auf die Ribonukleinsäure während der embryonalen Entwicklung der Regenbogenforelle

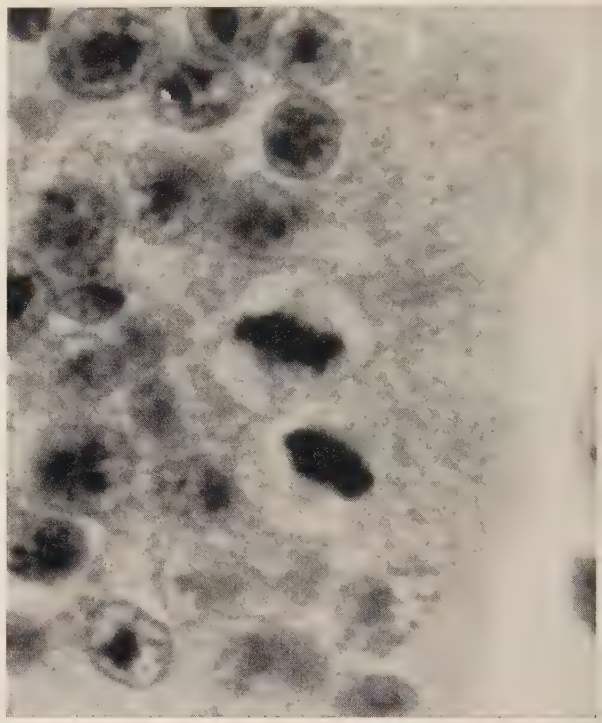
Eine wichtige Frage der chemischen Embryologie ist die Klarlegung des Zusammenhanges zwischen den Nukleinsäuren und der Vitalität des Embryos. Brachet[1] zeigte, dass das Absterben der Letalhybriden während der Gastrulation von einer gestörten Nukleinsäuresynthese begleitet ist. Diese konnte auch von anderen Forschern (Chen[2], Gregg und Løvtrup[3]) nachgewiesen werden. Für die Voraussetzung, dass zwischen den Nukleinsäuren und der Vitalität des Embryos ein Zusammenhang besteht, sprechen auch die Befunde von Trifonova[4]. Auch unsere früheren Versuche an Forelleneiern zeigen einen wahrscheinlichen Zusammenhang zwischen der Resistenz des Embryos gegen ungünstige Einflüsse der Umwelt und der Menge der Nukleinsäuren im Embryo (Churý und Pánek[5]).

An diese Versuche anknüpfend verfolgten wir die täglichen Veränderungen der Ribonukleinsäure während der embryonalen Entwicklung der Regenbogenforelle einerseits und den Einfluss der Befruchtung mit Spermagemisch auf die Ribonukleinsäure anderseits. Die Befruchtung der Forelleneier wurde künstlich durchgeführt. Insgesamt wurden 1500 Eier benutzt. Die Eier wurden in zwei Gruppen von je 750 geteilt. Die eine Gruppe (I) wurde mit 1 ml Sperma, die zweite Gruppe (II) mit 1 ml Spermagemisch befruchtet. Das Spermagemisch wurde aus zwei gleich grossen Spermamengen hergestellt. Die Befruchtung wurde immer nur mit gut beweglichen Spermien durchgeführt. Diese wurden mikroskopisch kontrolliert. Nach der Befruchtung wurden die Eier in Brutapparaten mit Wasserleitungswasser bis zum Ausschlüpfen aufbewahrt. Während der Entwicklung der Eier schwankte die Wassertemperatur um 11,5°C (± 1°C).

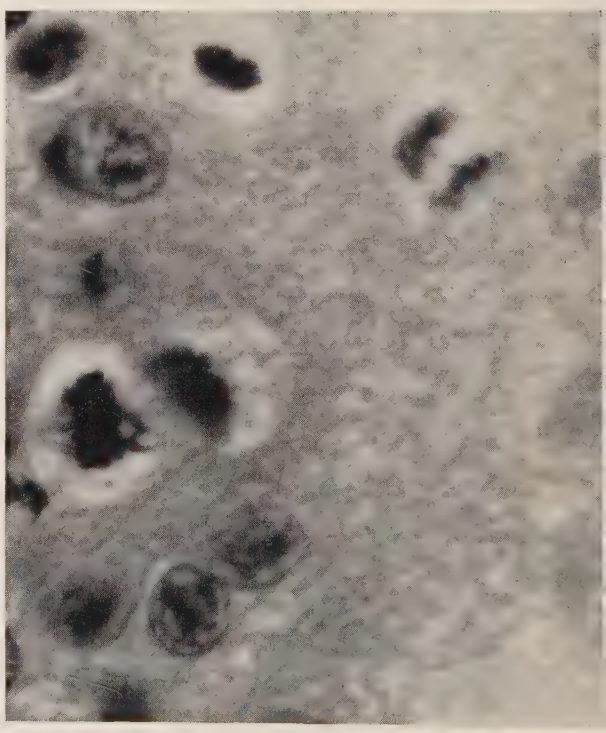
Die Ribonukleinsäure wurde täglich im Zeitintervall von 24 h nach der Methode von Davidson *et al.*[6] bestimmt. Zur Bestimmung dienten nur Eier, welche in der Hoferschen Lösung (Demoll und Maier[7]) aufbewahrt wurden. Jede Bestimmung wurde an 5 Eiern durchgeführt und fünfmal wiederholt.

[1] J. Brachet, *Embryologie chimique* (Paris 1947).
[2] P. S. Chen, Exper. *10*, 212 (1954).
[3] J. R. Gregg und S. Løvtrup, Biol. Bull. *108*, 29 (1955).
[4] A. N. Trifonova, Izv. Akad. Nauk SSSR, biol. *1*, 67 (1955).
[5] J. Churý und K. Pánek, Scripta med. *27*, 203 (1954); *29*, 128 (1956).
[6] J. N. Davidson *et al.*, Biochem. J. *44*, 5 (1949).
[7] R. Demoll und H. N. Maier, *Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas* (Stuttgart 1924), S. 438.

Die Menge der Ribonukleinsäure wurde auf ein Ei um gerechnet. Gleichzeitig mit der Bestimmung der Ribo nukleinsäure wurde die Entwicklung makro- und mikro



a



b

Schnitt durch den Embryo der Regenbogenforelle am 10. Tage de Entwicklung. Abbildung *a* Gruppe I. Zwei Metaphasen. Gut aus gebildete Spindel. Abbildung *b*. Gruppe II. Anaphasenbrücke un Abspaltung der Chromosomen in der Metaphase. Färbung: Häma toxylin/Eosin.

Entwicklungstag	Stadium	Gruppe I	Gruppe II
		Ribonukleinsäure γ/Ei	Ribonukleinsäure γ/Ei
0	O	unbestimmbar	unbestimmbar
1	4 Blastomeren	18	22
2	Morula	21	18
3	Blastula	18	16
4	Frühgastrula	11	15
5	Frühgastrula	21	19
6	Mittelgastrula	20	24
7	Mittelgastrula	18	20
9	Spätgastrula	16	32
10	Spätgastrula	14	24
11	Gehirn und Organe Differentiation	35	28
12		12	23
13		13	23
14		15	25
15		19	22
16	makroskopisch sichtbare Augenpigmentierung	21	16
17		14	17
18		16	19
19		17	20
21	makroskopisch sichtbare Augenpunkte	20	23
22		23	20
23		21	19
25	Schlüpfen	25	24

skopisch verfolgt und die Bilder mit den Angaben und Abbildungen von PASTEELS[8] verglichen.

Bei den angegebenen Temperaturverhältnissen begann die Gastrulation am 4. Tag und endete am 10. Tag nach der Befruchtung der Eier. Vergleichen wir die Geschwindigkeit der Entwicklung der Eier mit den Angaben im Schrifttum, zum Beispiel mit jenen von DEVILLIERS und ROSENBERG[9], so verlief die Gastrulation in unseren Versuchen schneller. Dies kann durch höhere Wassertemperatur erklärt werden, da die Geschwindigkeit der Entwicklung der Regenbogenforelle von der Temperatur stark abhängig ist (SCHÄPERCLAUS[10]).

Makroskopisch konnten keine Unterschiede in der Entwicklung zwischen der 1. und der 2. Gruppe festgestellt werden. Mikroskopisch wurden bei den Embryonen der 2. Gruppe am 9. und 10. Tag der Entwicklung Mitoseaberrationen aufgefunden. Diese bestanden meistens in Chromosomenklumpung, Chromosomenabspaltung und Anaphasebrücken (Abb. 1*b*).

Die Veränderungen der Menge der Ribonukleinsäure während der Entwicklung der Regenbogenforellenembryonen in der 1. und 2. Gruppe sind übersichtlich in der Tabelle angeführt.

Die Angaben der Tabelle zeigen, dass unbefruchtete Eier der Regenbogenforelle keine chemisch bestimmbare Ribonukleinsäure enthalten. Diese Tatsache wurde früher von VAN DER GHINST[11] festgestellt. Die Frage, ob wirklich gar keine Ribonukleinsäure in den unbefruchteten Eiern der Regenbogenforelle vorkommt, bleibt aber weiteren Untersuchungen offen. Ich möchte hier nur an die Arbeit von MARSHAK[12] erinnern, in der gezeigt wurde, dass das Ausbleiben einer positiven Reaktion auf Nukleinsäuren nicht immer mit der völligen Abwesenheit dieser Säuren verknüpft sein muss. Anderseits zeigen die Angaben der Tabelle, dass während der embryonalen Entwicklung eine Synthese der Ribonukleinsäure in den Forelleneiern stattfindet, entsprechend früheren Angaben (VAN DER GHINST[11]). Unsere Befunde zeigen weiter, dass während der embryonalen Entwicklung der Regenbogenforelle die Ribonukleinsäuremenge um einen durchschnittlichen Wert mehr oder weniger schwankt. Die Schwankungen werden durch Befruchtung mit einem Spermagemisch verstärkt, am stärksten während der zweiten Hälfte der Gastrulation und während der Entwicklung des Embryos zwischen der beendeten Gehirndifferentiation und der makroskopisch sichtbaren Augenpigmentierung. Die Unterschiede zwischen der Ribonukleinsäuremenge in der 1. und der 2. Gruppe sind am 9., 11., 12., 13. und 14. Tag nach der Befruchtung der Eier statistisch hoch bedeutsam ($P = 0{,}002$ oder kleiner). Zur Zeit der stärksten Schwankungen des Ribonukleinsäuregehaltes in den Eiern der 2. Gruppe gibt es häufige Mitosestörungen. Es ist unsicher, ob diese auf eine Störung der Thymonukleinsäuresynthese zurückzuführen sind, weil diese Säure nicht bestimmt wurde. Vergleicht man die Kerne der Abbildung 1*a* und 1*b* und die Mitosefiguren, so kann man mit Vorsicht die Voraussetzung machen, dass bei den Eiern der 2. Gruppe doch eine Störung der Thymonukleinsäuresynthese während der Mitose vorhanden sein könnte.

Während der ganzen Entwicklungszeit beträgt die durchschnittliche Menge der Ribonukleinsäure pro Ei in der 1. Gruppe 18 γ, in der 2. Gruppe 21 γ. Da die Sterblichkeit der Embryonen während der embryonalen Entwicklung in der 2. Gruppe um 42% kleiner war als die Sterblichkeit der Embryonen der 1. Gruppe, kann angenommen werden, dass der Ribonukleinsäure während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Gestaltung der Vitalität zukommt. Unsere Befunde stützen somit die Voraussetzung von TRIFONOVA[4].

J. CHURÝ

Biologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno (Tschechoslowakei), den 3. Januar 1957.

[8] J. PASTEELS, Arch. biol. *47*, 205 (1939).

[9] CH. DEVILLIERS und J. ROSENBERG, C. r. Acad. Sci. Paris *237*, 1561 (1953).

[10] W. SCHÄPERCLAUS, *Lehrbuch der Teichwirtschaft* (Berlin 1933).

[11] M. VAN DER GHINST, Arch. Biol. *45*, 729 (1934).

[12] A. MARSHAK und C. MARSHAK, Exp. Cell. Res. *5*, 288 (1953).

Résumé

La fécondation des œufs de la truite avec du sperme mélangé influence la quantité d'acide ribonucléique au cours de la gastrulation. L'augmentation de l'acide ribonucléique est accompagnée d'une réduction de la mortalité des embryons. L'œuf non fécondé ne contient pas d'acide ribonucléique chimiquement déterminable. Cet acide est synthétisé au cours du développement à partir de la fécondation des œufs. Il n'est pas certain que la fécondation avec du sperme mélangé trouble la synthèse de l'acide thymonucléique pendant la mitose.

Larvale und imaginale Mitteldarmchromosomen von *Drosophila repleta*

Die morphologische Untersuchung der Chromosomen in Interphasekernen ist – abgesehen von heterochromatischen oder künstlich aus Interphasekernen isolierten Chromosomen – hauptsächlich an den Riesenchromosomen der Dipterenlarven möglich. Deren Ausbildung und Struktur variiert von Art zu Art wie auch von Gewebe zu Gewebe in der gleichen Larve[1]. Sie sind in ihrem Entwicklungsgrad und in ihrer endgültigen Form stark von äusseren Faktoren abhängig. Sie stellen somit dynamische Elemente dar[2], deren Ausbildung entweder während der Metamorphose der Larve oder mit dem Absterben der Imago beendet ist. Da zum Beispiel die Malpighischen Gefässe nicht histolysiert, sondern von der Imago übernommen werden (vgl. Bodenstein[3]) kann die Entwicklung der larvalen Chromosomen in diesen Organen in der Imago fortschreiten, und in älteren Fliegen erreichen die Chromosomen fast die Grösse der Speicheldrüsenchromosomen der Larven. Ausser diesen ursprünglich larvalen Chromosomen kann man bei *Drosophila repleta* (auch bei *D. subobscura*) in imaginalen Zellen des Darms der älteren Fliegen deutlich Interphasechromosomen beobachten, die aber im Vergleich zu grossen larvalen Chromosomen sehr klein sind (Abb. *a–e*). Sie bestehen in manchen Kernen aus fast vollkommen despiralisierten, nicht gepaarten dünnen Fäden, auf denen sehr kleine chromomerenartig gefärbte Stellen erkennbar sind. In anderen Kernen kommen in verschiedenem Grade kontrahierte, gepaarte oder völlig synaptische Chromosomen vor. Die Chromomeren auf den gepaarten Chromosomen scheinen grösser und stärker gefärbt als die auf nicht gepaarten, während sie im synaptischen Zustand der Homologen nicht erkennbar sind. Diese Chromosomen sind homogen gefärbt und spiralig. Ihre Länge und Färbbarkeit variiert von Zelle zu Zelle wie die der nicht synaptischen Chromosomen. Solche Stadien werden auch an larvalen Chromosomen zu Entwicklungsbeginn beobachtet (Abb. *b*). Hier folgen sie normalerweise so hintereinander, dass in jüngeren Kernen die despiralisierten Typen vorliegen, die spiraligen Chromosomen aber in grösseren Kernen vorkommen. Da eine solche Reihenfolge in imaginalen Zellen nicht festgestellt werden konnte, lässt es sich nicht entscheiden, ob die spiraligen Stadien der larvalen und der imaginalen Chromosomen einander entsprechen und die Entwicklung der letzteren aus unbekannten Gründen stehenbleibt[5] oder ob eine neue Despiralisation und Trennung der Homologen stattfindet.

Die kontrahierten Chromosomen der nicht zerplatzten Kerne vereinigen sich mit einem oder beiden Enden in der Nähe des Nukleolus. Hier bilden sie ein Chromozentrum, welches aus einigen schwach chromatischen Fäden besteht und mit dem Nukleolus in Verbindung steht. Von dieser Stelle aus verteilen sich die spiraligen Chromosomen, vielfach gewunden, in einer offenbar regelhaften regionalen Verteilung im Kernraum.

Dieses auch an larvalen Mitteldarmchromosomen zu Entwicklungsbeginn beobachtete Verhalten der Chromosomen ähnelt den Übergangsstadien der Chromosomen von Prophase zu Metaphase in sich teilenden Zellen und spricht für die Auffassung, dass jedes Chromatid einen um seine Längsachse gewundenen, an manchen

[1] W. Beermann, Naturwissenschaften *37*, 543 (1950); Chromosoma *5*, 139 (1952). – M. Breuer und C. Pavan, Chromosoma *7*, 371 (1955). – A. Sengün, Comm. Fac. Sci. Univ. Ankara *1*, 187 (1948); Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. B *20*, 267 (1955).

[2] T. S. Painter, Cold Spring Harbor Symposium on quantitative Biology *9*, 47 (1941). – E. Borysko, Bull. John Hopkins Hosp. *92*, 151 (1953).

[3] D. Bodenstein, in *Biology of Drosophila* (New York 1950).

[4] Präparation der Fliegen in physiologischer Kochsalzlösung, Vorfixierung in 60% Essigsäure mit stark verdünntem Orcein. Färbung mit 2% Aceto-Orcein. Auswaschen in Alkohol. Einbetten in Euparal.

[5] Die Beobachtung von quergestreiften Chromosomen im Darmepithel einer unbestimmten Dipterenart macht es wahrscheinlich, dass die Entwicklung bei *D. repleta* auf dem spiraligen Stadium stehen bleibt.

Interphasechromosomen aus zerplatzten Kernen des Mitteldarmes einer Fliege (*a*, *d* und *e*) und einer Larve (*b* und *c*). Abbildung *b* stammt aus einer kleinen, *c* einer grossen Zelle. – Alle Abbildungen sind mit einem Reichert-Mikroskop, Ok. 10× und Ölimmer. Obj. 100× gezeichnet.

Stellen mehrfache Windungen zeigenden Faden darstellt, der sich kontrahieren und strecken kann. Im Modellversuch kann die Kontraktion durch stetiges Drehen eines Fadens, der zahlreiche einfache Knoten und ein oder mehrere Festpunkte besitzt, veranschaulicht werden. Die Knoten sollen die Chromomeren im gestreckten Chromatid darstellen. Dreht man einen solchen Faden an seinen freien Enden, so entstehen zunächst Windungen, die je nach Art und Beschaffenheit des Fadens verschiedene Durchmesser haben. Bei Fortsetzung des Drehens treten mehrfach gewundene Knoten verschiedener Grösse auf, die mit den als Chromomeren bezeichneten Stellen der Chromatiden identisch sein könnten. Weiteres Drehen bewirkt das Auftreten von Spiralen, die den Spiralen der Chromosomen entsprechen würden.

A. Sengün*

Institut für allgemeine Biologie, Wien, den 11. Oktober 1956.

Summary

In certain tissues of *D. repleta*-flies, it is possible to observe the interphase chromosomes that are either of larval origin or that occur in imaginal tissues. The imaginal interphase chromosomes from the midgut are similar to the small larval midgut chromosomes in the early phases of their development.

* Permanente Adresse: Zooloji Enstitüsü, Üniversite, Istanbul.

Über die Entwicklung des Fremdkörpergranuloms in verschiedenen Organsystemen

Wir haben in früheren Arbeiten eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Mesenchymreaktionen mit Hilfe des Fremdkörpergranuloms nach subkutaner Implantation beschrieben[1]. Diese Reaktion wird nach systemischer Applikation durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Polysaccharide[2], Thyroxin[3], Nebennierenrindensteroide, wie Cortexon[4], gefördert, durch andere Substanzen, die anti-inflammatorischen Nebennierenrindensteroide, wie Cortison, Hydrocortison, 9α-Fluoro-hydrocortison, Prednison und Prednisolon[5], und durch Phenothiazine und aromatische Hydrazine[6] gehemmt.

Tabelle I. Granulomgewicht 7 Tage nach Implantation eines 5-mg-Implantates in verschiedene Organe

Implantation	Tierzahl	Granulomgewebe (Frischgewicht) mg S. E.
subkutan (2 Implantate beidseitig dorsal)	26	15,7 ± 1,5
in die Leber (1 Implantat unter die Leberkapsel)	26	23,4 ± 2,8
in die Niere (1 Implantat in jede Niere unter die Nierenkapsel)	26	13,5 ± 1,7
in die Hoden (1 Implantat in beide Hoden)	26	35,7 ± 3,1

Bei verschiedenen pathologischen Zuständen ist die Bindegewebsreaktion ausschliesslich an Mesenchymstrukturen bestimmter Organe, wie zum Beispiel der Niere, der Leber, gebunden[7]. Es schien deshalb für eine weitere Differenzierung der Bindegewebsreaktion wichtig zu untersuchen, ob mit Hilfe der genannten Methode quantitative Unterschiede der Mesenchymreaktion verschiedener Organe festzustellen sind, bzw. ob die Mesenchymreaktion in verschiedenen Organen durch differente Einwirkungen beeinflusst werden kann.

Methodik. Voraussetzung für die Untersuchung dieser Frage ist, dass einerseits unter vollkommen sterilen Kautelen gearbeitet wird, und andererseits, dass die zu implantierenden Presslinge Dimensionen aufweisen, die in optimalen Verhältnissen zu dem betreffenden Organ stehen. Deshalb wurden sterile Presslinge gewählt, deren Gewicht genau 5 mg ± 0,1 mg beträgt und die einen Durchmesser von 2,5 mm besitzen. Es wurde die Reak-

[1] R. Meier, W. Schuler und P. Desaulles, Exper. *6*, 469 (1950). – [2] R. Meier, P. Desaulles und B. Schär, Verh. naturf. Ges. Basel *67*, 447 (1956). – [3] P. Desaulles, Z. ges. exp. Med. *124*, 30 (1954). – [4] R. Meier, F. Gross und P. Desaulles, Klin. Wschr. *29*, 653 (1951). – [5] W. W. Byrnes *et al.*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *91*, 67 (1956). – G. W. Liddle, M. M. Pechet und F. C. Barter, Science *120*, 496 (1954). – [6] R. Meier und P. Desaulles, J. Physiol. (im Druck). – [7] D. Lehr und C. R. Martin, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *93*, 596 (1956).

Tabelle II. Wirkung von Cortexon auf die Granulombildung 7 Tage nach Implantation eines 5-mg-Implantates

Implantation	Tierzahl	Kontrollen	Tierzahl	Cortexon subkutan	
				2,5 mg/kg	10 mg/kg
		mg S.E.		mg S.E.	mg S.E.
subkutan (2 Implantate beids. dorsal)	26	15,7 ± 1,5	16	16,1 ± 1,2 (+2%)	10,5 ± 1,5 (+30%)
in die Leber (1 Implantat unter die Leberkapsel)	26	23,4 ± 2,8	16	32,5 ± 2,4 (+39%)	25,2 ± 2,3 (+9%)
in die Niere (1 Implantat in jede Niere unter die Nierenkapsel)	26	13,5 ± 1,7	16	16,7 ± 1,4 (+23%)	14,9 ± 1,2 (+10%)
in die Hoden (1 Implantat in beide Hoden)	26	35,7 ± 3,1	16	36,2 ± 3,4 (+1%)	46,0 ± 5,0 (+31%)

tionsfähigkeit des Bindegewebes der Subcutis, Leber, Niere und der Hoden untersucht.

Die Versuche wurden an männlichen Ratten im Gewicht von 100 bis 110 g durchgeführt. Die Nahrung bestand aus vollwertigen Rattenkuchen (Allied Mills Chicago) und Brunnenwasser *ad libitum*. Die Tiere wurden in Metallkäfigen und auf Metallrost bei konstanter Lufttemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Den Tieren wurde am ersten Versuchstag unter Ätherrausch und sterilen Kautelen ein steriler Whatman-Papierpressling zu 5 mg entweder beidseits in die Subcutis, unter die Leberkapsel, Nierenkapsel oder die Hoden implantiert. 7 Tage nach Versuchsbeginn wurden entstandene Granulome herauspräpariert und gewogen.

Für die Versuche mit Cortexon wurde das Präparat in öliger Lösung bei subkutaner Applikation täglich während 6 Tagen appliziert.

Resultate. Aus Tabelle I ergibt sich mit voller Eindeutigkeit, dass die Mesenchymreaktion in verschiedenen Organen quantitativ deutliche Unterschiede zeigt. Der Stärke nach ist die Reaktion im subkutanen Gewebe und der Niere gleich, deutlich grösser ist die Reaktion in der Leber, fast doppelt so gross diejenige in Testikelgewebe. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass auf den gleichen auslösenden Vorgang und unter gleichen Zeitabständen das Mesenchymgewebe verschiedener Organe verschieden stark reagiert. Es wird noch zu untersuchen sein, welche Faktoren, sei es die endogene Wachstumstendenz des Bindegewebes, die Freisetzung wirksamer Stoffe aus dem Gewebe oder die zusätzlich vorhandenen Gewebskomponenten, für diese verschiedenen Reaktionen verantwortlich sind.

Als Beispiele der Beeinflussung der Reaktion der verschiedenen Mesenchymtypen geben wir den Einfluss der Cortexonbehandlung. Es ist bekannt, dass Cortexon steigernd auf die subkutane Granulombildung[8] wirkt, aus Tabelle II ist ersichtlich, dass das intratestikuläre Granulom ein analoges Verhalten bei gleicher Dosierung zeigt. Bei höheren Dosen wirkt Cortexon hemmend[8]. Intrahepatische und intrarenales Granulom zeigen eine erhebliche Förderung bei kleineren Dosen und eine Hemmung bereits bei solchen Dosen, die auf subkutanes und intratestikuläres Granulom noch steigernd wirken.

Trotzdem eine weitere detaillierte Analyse besonders nach der Richtung des histologischen Bildes dieser Befunde notwendig ist, zeigen sie doch eindeutig, dass bei einer gleichartigen primären Einwirkung eine verschieden starke Mesenchymreaktion in verschiedenen Organen auftritt und dass die Mesenchymreaktion ausgesprochene Differenzen der Beeinflussbarkeit abhängig vom Orte der Entstehung aufweist. Diese Feststellung bietet grundsätzliche Möglichkeiten zur Differenzierung organgebundener Mesenchymreaktionen.

R. Meier und P. Desaulles

Forschungslaboratorium der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 25. Februar 1957.

Summary

The weight has been measured of the granuloma produced after implantation of the same foreign body in the kidneys, the testes, the liver and the subcutaneous tissue of male rats. It was found that granulomae in the testes and liver are nearly twice as heavy as in the kidney or in the subcutaneous tissue. Enhancement or inhibition of this reaction by treating the animals with cortexone shows organ-dependant effects on granuloma formation.

[8] R. Meier und P. Desaulles, Riv. Iberica Endocrin. *3*, 556 (1956).

Gesteigertes Wachstum bei Ratten nach Leberschädigung durch CCl_4*

Für Untersuchungen über die Beziehungen zwischen antidiuretischem Hormon (ADH) und Leber wurden Ratten während längerer Zeit nach der Methode von Kaufmann[1] behandelt. Wie mitgeteilt worden war, entwickelt sich nach 15–17 Injektionen von 0,1 ml CCl_4 in der Leber eine typische, annuläre Zirrhose. Diese Ergebnisse konnten wir in unseren eigenen Versuchen bestätigen und daneben bei den leberkranken Ratten eine ADH-Inaktivierung beobachten[2].

Die Abbildung zeigt links zwei behandelte Tiere, rechts zwei Kontrolltiere. Die Durchschnittswerte des Körpergewichtes von je zehn Tieren differieren um 40 g.

Eine Gruppe der mit CCl_4 behandelten Ratten wurde nicht weiter ausgewertet. Bei diesen Tieren bemerkten wir nach etwa einem halben Jahr, dass sie sich von den gleichaltrigen desselben Stammes, welche genau gleich gefüttert worden waren, durch ihre aussergewöhnliche Grösse unterschieden. Daraufhin wurde bei einer neuen Gruppe junger, mitten in der Entwicklung stehender Ratten (70–90 g schwer) durch chronische CCl_4-Gaben eine Leberläsion hervorgerufen. Die Mehrzahl dieser Tiere wurde wiederum wesentlich grösser als die unbehandelten Kontrollen. Nach ½–1 Jahr war der Unterschied am deutlichsten.

Nach unserer Ansicht ist bei Leberschädigung junger Tiere der Abbau des somatotropen Hormons, das während der Entwicklung gebildet wird, gehemmt. Der so entstehende Hormonüberschuss bzw. andauernd hohe Somatotropin-Spiegel könnte für das gesteigerte Wachstum dieser Tiere verantwortlich sein. Dies würde zugleich die Annahme eines Abbaus von somatotropem Hormon in der Leber bestätigen. Pathophysiologisch wäre eine eventuelle derartige Rolle der Leber bei endokrinen Störungen zu prüfen.

J. Hankiss

I. Klinik für innere Krankheiten, Medizinische Universität Debrecen (Ungarn), den 28. Januar 1957.

Résumé

Si l'on provoque une cirrhose du foie sur des rats blancs par l'injection chronique de CCl_4, les jeunes, en

* Vorläufige Mitteilung.

[1] G. Kaufmann, Beitr. Pathol. Anat. *113*, 253 (1953).

[2] J. Hankiss, Z. Vit. Horm. Fermentforsch. (im Druck).

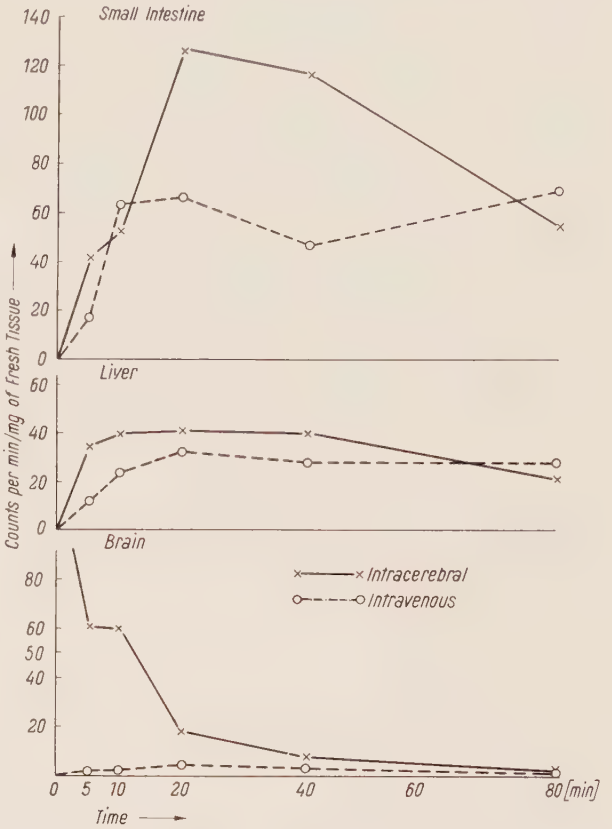
voie de développement, atteignent une plus grande taille. L'auteur suppose que ce phénomène est dû à la prolongation de la durée d'activité de l'hormone somatotrope du foie atteint.

Brain Concentrations of LSD–25 (Delysid) after Intracerebral or Intravenous Administration in Conscious Animals

After intraperitoneal administration of C^{14} labelled LSD to rats, Boyd *et al.*[1] found 48·5–71·2% of the dose in the gastrointestinal tract. Lanz, Cerletti, and Rothlin[2] showed that the drug disappeared rapidly from the blood and concentrated in the liver. The concentration in the brain also decreased rapidly but was independent of the blood level after equilibrium had been established. In the mouse Stoll *et al.*[3] showed that intravenous C^{14}-Delysid underwent chemical alteration and was rapidly excreted via the liver and bile into the small intestine. Similar results were obtained in rats with biliary fistulas. In all cases the concentration of the drug in the brain was extremely small. In view of the profound psychic changes induced by very small doses of Delysid, it is essential to obtain more information to correlate brain concentrations with behavoral changes. We have now undertaken experiments to study the distribution and elimination of LSD in animals, a relatively high brain concentration of LSD being produced by intracerebral injection. We also compared these animals with control animals treated with the drug by the intravenous route. The concentration of the C^{14}-LSD and its metabolites in the brain, liver, and small intestine was followed by activity measurements using the same procedures and counting equipment as previously described by Stoll *et al.*[4].

The C^{14}-Delysid (25 μg, 2·73 $\times$ 10^5 c.p.m. per animal) was injected intracerebrally according to the procedure of Haley and McCormick[5] or intravenously via the caudal vein of white mice, which were decapitated in series of five after 5, 10, 20, 40 and 80 min. The organs of the same group and series were combined, homogenized with water, and aliquots of the suspension were analyzed after freeze-drying. The results presented graphically in the Figure are based on the mean of two determinations.

Changes in behavior of the mice began immediately after intracerebral injection and 3 min after intravenous injection; after that time the effects were indistinguishable in the two groups. The changes included hyperexcitability, sensitivity to sound and touch, piloerection, and a peculiar muscle twitch in the lumbar area accompanied by alternate stamping of all 4 feet. These symptoms were still present at the end of the observation period when the concentration of the drug in the brain had reached its lowest level, independently of the route of administration. This indicates that the very small amounts of the drug entering the brain after intravenous injection are sufficient to produce similar effects to those caused by the relatively large quantities introduced by intracerebral administration.



Radioactivity of organs after intracerebral and intravenous application of 25 μg C^{14}-Delysid per animal

The most surprising result of the present experiments is, however, the rapidity with which, after intracerebral injection, the drug leaves the brain, appears in the liver, and is excreted into the intestine (Figure). During the first hour of the experiment the concentration in the liver and the small intestine is even greater after intracerebral than after intravenous injection. Although this last finding cannot be completely explained at the present time, the results show very clearly that contrary to experience with other substances, e.g. adrenaline, the blood-brain barrier is only efficient for the inflow of Delysid from blood into the brain but practically nonexistent for the outflow from brain into the blood. A similarly rapid disappearance of LSD from the brain was confirmed in an experiment on 4 cats with Feldberg-Sherwood cannulae[6]. The intraventricular injection of 50 μg/kg (0·1 ml/kg of a solution containing 5·47 $\times$ 10^6 c.p.m./ml) resulted in a brain concentration of only 8–10% of the injected dose when the cats were sacrificed 10 min after injection. At this time the drug was already beginning to concentrate in the bile.

These experiments provide renewed evidence that only very low brain concentrations of Delysid are required to induce prolonged behavioral changes. The extremely rapid removal of LSD from the brain supports the idea that such changes are due rather to a reaction

[1] E. S. Boyd, E. Rothlin, J. F. Bonner, I. H. Slater, and H. C. Hodge, J. Pharmacol. exp. Therap. *113*, 6 (1955).

[2] U. Lanz, A. Cerletti, and E. Rothlin, Helv. physiol. pharmacol. Acta *13*, 207 (1955).

[3] A. Stoll, E. Rothlin, J. Rutschmann, and W. R. Schalch, Exper. *11*, 396 (1955).

[4] A. Stoll, E. Rothlin, J. Rutschmann, and W. R. Schalch, Exper. *11*, 396 (1955). – T. J. Haley and W. G. McCormick, Brit. J. Pharmacol. (in press).

[5] T. J. Haley and W. G. McCormick, Brit. J. Pharmacol. (in press).

[6] W. Feldberg and S. L. Sherwood, J. Physiol. *120*, 3 P (1953)

sequence triggered by LSD than to the permanent presence of the drug in the central nervous system.

T. J. Haley and J. Rutschmann

Research Laboratories, Sandoz Ltd., Basle, Switzerland, January 18, 1957.

Zusammenfassung

Die Radioaktivität in Gehirn, Leber und Dünndarm der Maus nach intravenöser und nach intrazerebraler Injektion von ^{14}C-Lysergsäure-diäthylamid (Delysid) wurde bestimmt. Es ergibt sich, dass die radioaktive Substanz nach intrazerebraler Injektion mindestens ebenso schnell in der Leber erscheint und durch die Galle in den Dünndarm ausgeschieden wird, als das bei intravenöser Anwendung der Fall ist. Da nach intravenöser Injektion des markierten Delysids nur eine minimale Aktivität im Gehirn erreicht wird, kann geschlossen werden, dass die Blut-Liquor-Schranke wohl den Übertritt des Delysids vom Blut ins Gehirn weitgehend hemmt, aber den Austritt der Verbindung aus dem Gehirn nicht behindert.

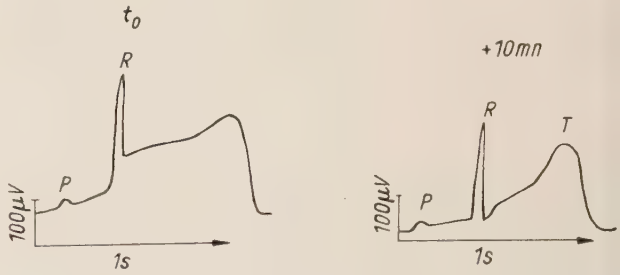
Die schnelle Ausscheidung von ^{14}C-markiertem Delysid aus dem Gehirn nach intraventrikulärer Injektion wurde in Versuchen an der Katze bestätigt.

L'asphyxie, moyen d'analyse de l'électrocardiogramme de grenouille

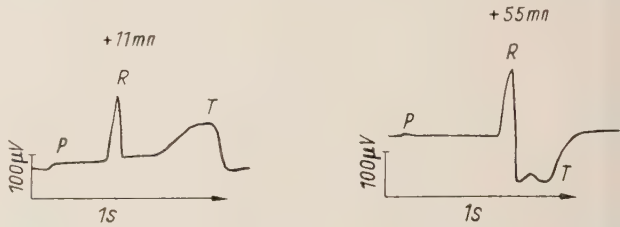
Dans un précédent travail[1] nous avons montré par voie chirurgicale, que le système sino-auriculaire – voire le sinus veineux seul – de grenouille pouvait livrer un train d'ondes électriques ternaire à sommets PRT. La voie chimique peut être une autre manière d'isoler les éléments d'un même système et peut l'être de façon aussi efficace que la manière chirurgicale. Précisément, avec l'acide monoiodacétique, il est possible de dissocier le fonctionnement auriculaire du fonctionnement ventriculaire du cœur de grenouille. En aérobiose, en solution de Ringer, à 20° C, un cœur subtotal[1] isolé, non perfusé mais soumis à une agitation périodique selon la méthode élaborée[2], montre un train d'ondes électriques ternaire typique. L'adjonction d'une solution de Ringer renfermant de l'acide monoiodacétique de telle sorte que la concentration finale en cet inhibiteur soit approximativement de $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ *M*, amène, après 1 h environ, l'arrêt de la contraction ventriculaire tandis que se maintient la contraction sino-auriculaire. Or, après amplification convenable, le tracé électrographique restitue un train d'ondes électriques ternaire à sommets PRT. La Figure ci-contre fait état de ces résultats.

Des faits comparables peuvent être obtenus au moment de l'arrêt ventriculaire avec un cœur subtotal de grenouille, placé en atmosphère d'azote dans du Ringer glucosé à 0,5 g/l.

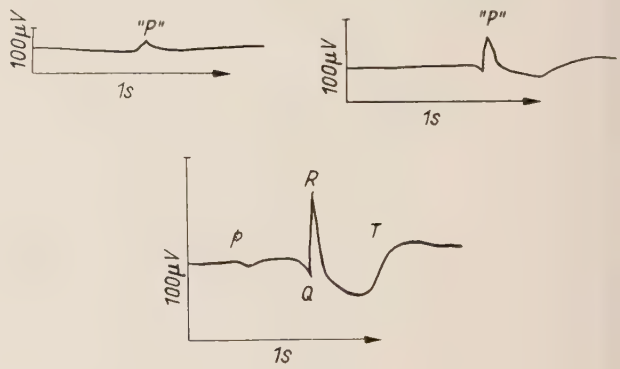
Le maintien de la seule activité sino-auriculaire nous paraît être la conséquence du métabolisme principalement – si ce n'est exclusivement – glucidique du ventricule[3], le glycogène en étant la source essentielle[4]. D'une part le système sino-auriculaire aurait un métabolisme non-exclusivement glucidique et, d'autre part, par suite de l'épaisseur du ventricule et de la minceur du système sino-auriculaire, l'asphyxie doit se faire sentir plus rapidement dans le ventricule que dans le système sino



Avant l'introduction de l'acide monoiodacétique



Après introduction de l'acide monoiodacétique



Système sino-auriculaire seul en mouvement (65e min)

auriculaire amenant l'arrêt du ventricule. Dans ces conditions le court-circuitage électrique par le ventricule ne se réalise plus et, seul, le système sino-auriculaire, encore fonctionnel, peut livrer, à l'amplitude près, un train d'ondes complet.

B. Rybak et J. Trépeau

Faculté des Sciences, Bordeaux, le 14 janvier 1957.

Summary

When the ventricle of the frog heart is stopped in anaerobiosis or in aerobic conditions by means of iodacetic acid, the sino-auricular system alone can give PRT deflections detected by a high electrical amplification.

[1] B. Rybak et J. Retail, Exper. *12*, 438 (1956).
[2] B. Rybak, C. r. Acad. Sci. *241*, 1411 (1955); *242*, 282 (1956).
[3] B. Rybak et J. Trépeau, C. r. Soc. Biol. (à paraître).
[4] F. Davies et B. Francis, J. Physiol. *100*, 329 (1941).

PRO LABORATORIO

Dispositif pour l'examen microscopique aux basses températures

Depuis Réaumur qui, en 1736, avait étudié la congélation d'insectes divers, les biologistes se sont toujours intéressés aux différents problèmes liés à l'action du froid sur les organismes vivants. Depuis peu, ces études ont pris un très grand intérêt d'ordre pratique puisqu'elles permettent d'envisager l'établissement de «banques de tissus conservés» utilisables en chirurgie. Les tissus ainsi congelés ont leur activité physiologique suspendue et peuvent conserver leur viabilité pendant de très longues périodes. Les travaux de Becquerel[1] ont montré cette suspension de la vie aux confins du zéro absolu dans le cas d'organismes très simples comme des bactéries, des spores préalablement desséchées. Le problème est plus délicat pour les tissus de mammifères. Supportant en effet très mal la dessiccation, leur résistance au froid est faible et, pour éviter de trop fortes altérations, il a fallu chercher soit dans la vitesse de congélation (Luyet[2]) soit dans les milieux de congélation (Parkes, Smith, Lovelock, Polge[3]) des techniques permettant la survie des tissus congelés. L'un des principaux problèmes consiste alors à connaître si les altérations se produisent au cours de la congélation proprement dite, pendant le séjour aux basses températures, ou bien lors du dégel et du retour aux températures normales.

Seul l'examen microscopique des tissus au cours du processus de congélation et de dégel peut permettre de suivre les processus d'altération dans leur intégrité et aucune méthode indirecte ne peut apporter une sécurité d'interprétation suffisante.

Divers appareils ont été réalisés dans ce but, mais aucun ne permet de dépasser $-120°C$ et tous n'assurent qu'un refroidissement très lent (20 min à 1 h) et difficilement réglable (Chambers et Hale[4]: microscope en chambre froide; Hocart et Monier[5]: dispositif métallique refroidi par un courant d'air froid; Smith et Smiles[6]: microscope avec platine spéciale de Harmer[7] refroidie par conduction métallique). C'est pourquoi, afin de réaliser des recherches très variées dans le domaine de la congélation, nous avons construit un dispositif spécial, voisin d'ailleurs comme conception du microscope utilisé par le Dr Cecil Taylor[8] du Rockefeller Institute de New-York. Notre appareil permet en effet de refroidir lentement ou brutalement les préparations examinées, de les observer, une fois congelées, par tous les procédés optiques classiques tout en maintenant la

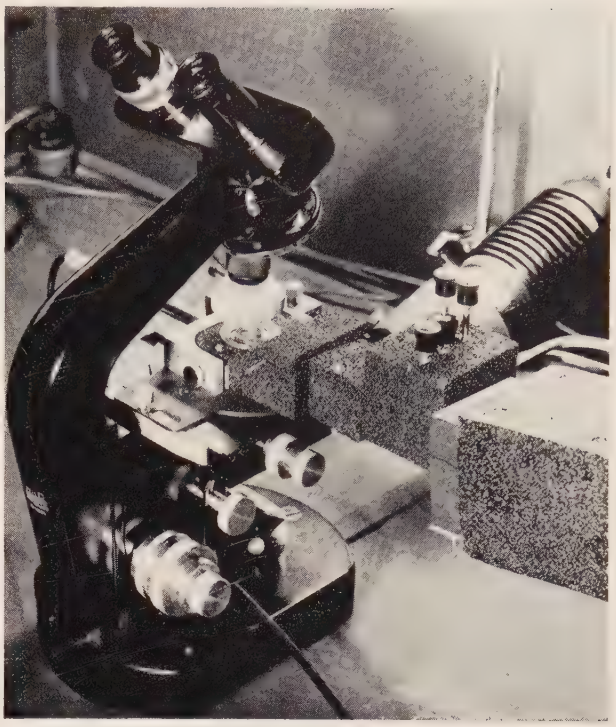


Fig. 1.

basse température constante, et d'opérer ensuite le dégel à la vitesse désirée (Fig. 2).

L'objet à examiner est porté par la glace supérieure *G 1* d'une cellule d'examen métallique *(Cell)* fermée à la partie inférieure par une deuxième glace optique en quartz (Fig. 2). Deux enceintes étanches *D 1* et *D 2* contenant du desséchant empêchent tout givrage au cours de l'observation. Tout l'ensemble de l'appareillage est soigneusement calorifugé par un coffrage en Klegecell (Résine synthétique de Kleber-Colombes, France). Pour l'obtention des températures extrêmes, le refroidissement est assuré par une circulation de propane liquide (*L*) contenu dans deux cuves identiques. Le propane refroidi par un bain périphérique (*BR*) d'azote liquide circule sous pression d'hydrogène alternativement d'une cuve à l'autre de façon automatique, par un ensemble de canalisations *T 1*, *T 2*. Pour obtenir une congélation très brutale, l'ensemble des conduites est d'abord refroidi en ouvrant les robinets *R 1*, *R 2*, et *R 7*, et en fermant *R 5* et *R 6*. Une spirale chauffante *Ch* empêche que, pendant ce temps-là, la cellule d'examen ne se refroidisse par simple conduction thermique le long des conduites. Quand la température *Th 2* est devenue stable (environ $-160°C$), on ferme *R 7* et on ouvre *R 5* et *R 6* en coupant le chauffage *Ch*. Le liquide passe brutalement dans la cellule d'examen où le refroidissement est instantané. On peut atteindre $-140°C$ en moins d'une seconde, en *Th 1*. Le faible volume de la cellule (2 cm^3) et la forte quantité de propane qui circule par minute (800 cm^3) assurent une parfaite stabilité de la température en *Th 1* pendant de très longues périodes d'observation. Le réchauffement peut être effectué à volonté en fermant les robinets *R 1* et *R 2* et en envoyant de l'isopentane à la température voulue par les robinets *R 3* et *R 4*. Si l'on désire atteindre des températures moins basses, on peut obtenir tous les types de refroidissement en faisant varier le liquide circulant (isopentane, essence, alcool, acétone) et la température du bain réfrigérant (mélange

[1] P. Becquerel, C. R. Acad. Sci. *231*, 261 (1950).

[2] B. J. Luyet et P. M. Gehenio, *Life and Death at Low Temperatures* (Biodynamica ed. Normandy, Missouri, 1940), p. 1.

[3] C. Polge, A. U. Smith et A. S. Parkes, Nature *166*, 666 (1949). – A. U. Smith et A. S. Parkes, in *Preservation and Transplantation of Normal Tissues*, Ciba Foundation Symposium (Churchill, London 1954), p. 76. – J. E. Lovelock, in *Preservation and Transplantation of Normal Tissues*, Ciba Foundation Symposium (Churchill, London 1954), p. 131.

[4] R. Chambers et H. P. Hale, Proc. Roy. Soc. *110*, 336 (1932).

[5] R. Hocart et J. C. Monier, Bull. Suisse Min. Pétr. *29* (1949).

[6] A. U. Smith et J. Smiles, J. Roy. Micr. Soc. *73*, 134 (1953).

[7] J. R. Harmer, J. Roy. Micr. Soc. *73*, 128 (1953).

[8] A. C. Taylor, Non publié, communication personelle (1956).

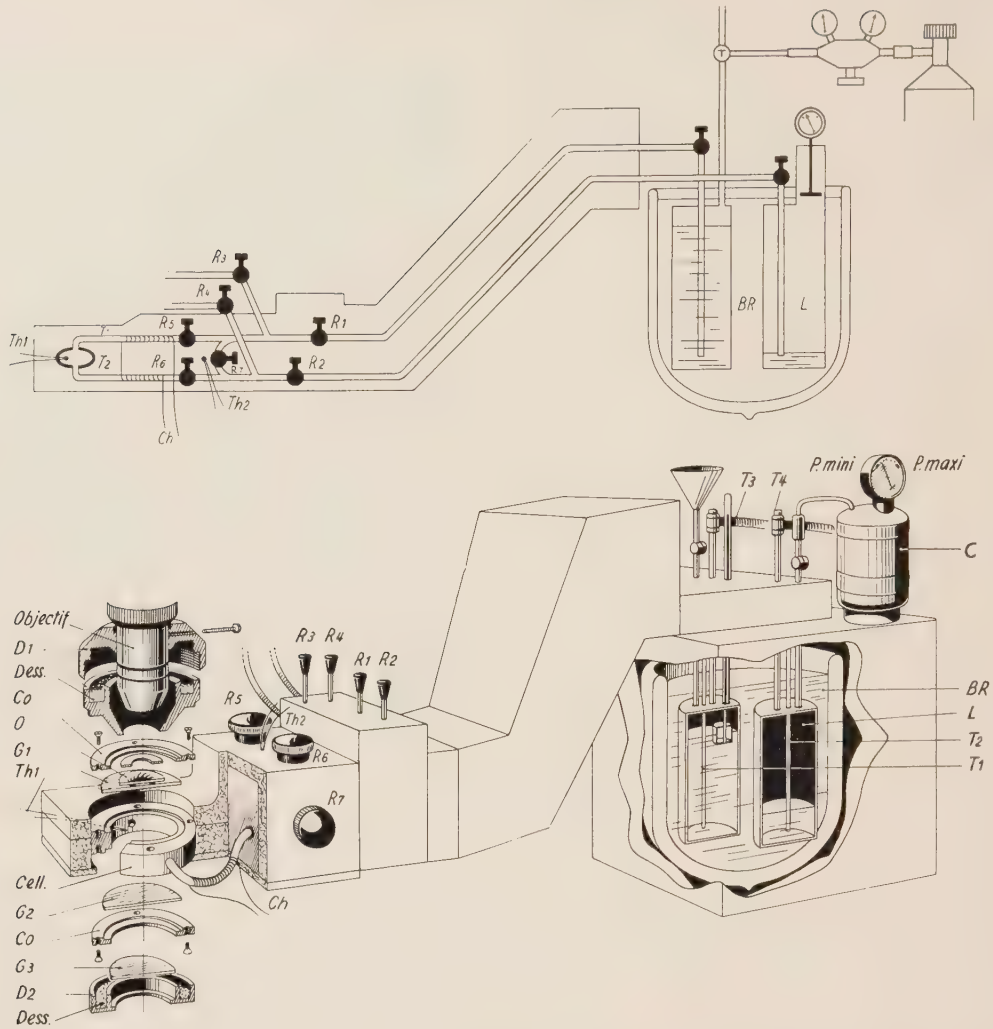


Fig. 2. Principe de fonctionnement et dessin schématique du dispositif utilisé pour la congélation rapide: *L* liquide de circulation – *BR* bain réfrigérant – *C* réservoir de compensation – *T* robinet d'arrivée de gaz et de mise en décompression sur l'atmosphère – *T1*, *T2* tubulures de circulation du liquide réfrigérant – *T3*, *T4* tubulures d'arrivée de gaz – *R1*, *R2* robinets de commande du liquide réfrigérant – *R3*, *R4* robinets de commande du liquide de réchauffement – *R5*, *R6* robinets de commande de la cellule d'examen – *R7* robinet de commande du court-circuit – *Th1* thermocouple de la cellule d'examen – *Th2* thermocouple contrôlant l'ensemble des conduites – *Cell* cellule d'examen – *Ch* spirale chauffante – *D1*, *D2* enceintes étanches de dessiccation (Dess. desséchant) – *G1*, *G2*, *G3* glaces optiques en quartz mince – *Co* couvercles maintenant les glaces en place – *O* objet à examiner.

alcool-glace carbonique). On peut enfin opérer une réfrigération lente en faisant circuler de l'hydrogène refroidi par passage dans l'azote liquide. Un contrôle thermostatique en *Th1* règle alors le débit d'hydrogène en fonction de la température à atteindre et du temps désiré pour y parvenir. En dessous de $-100°C$ il est nécessaire de poursuivre la réfrigération par une circulation de propane liquide. Il est alors possible d'atteindre $-180°C$ en *Th1*.

De nombreux travaux sont actuellement en cours avec cet appareillage et nous pensons pouvoir donner prochainement une première série de résultats sur les divers phénomènes se produisant lors de la congélation de tissus animaux maintenus en culture.

L. R. Rey

Ecole Normale Supérieure, Laboratoire de Zoologie, Université de Paris, le 19 décembre 1956.

Summary

In order to improve the studies of the different phenomena occurring during the deep-freezing of living animal tissues, the author has built a microscopic device with which it is possible to examine fragments of tissues during freezing and thawing. This apparatus gives different rates of cooling and re-warming, fast and slow, both controlled with accuracy. Temperatures as low as $-180°C$ are easily reached.

PRO LABORATORIO

Bariumtitanat-Druckgeber für Dekompressionsversuche

Für die Registrierung von Explosionsdruckwellen während des Durchganges durch den Körper wurde von Clemedson[1] sowie Clemedson und Pettersson[2]

[1] C.-J. Clemedson, Acta physiol. scand. *37*, 204 (1956).

[2] C.-J. Clemedson und Hj. Pettersson, Amer. J. Physiol. *184*, 119 (1956).

Bariumtitanat als Pressure Transducer (Atlantic Research Corp., Mod. BC–10) verwendet. KOLDER[3] registrierte die Dekompressionszeit im Verlauf explosiver Dekompressionen mit einem Bariumtitanat (Ingelen-Freudenthal, Wien) als Geber. Der Eingangswiderstand handelsüblicher Kathodenstrahloszillographen reicht jedoch nicht aus, die lange Eigenzeitkonstante des Bariumtitanat auszunützen. Es wurde daher ein einfacher Vorverstärker mit freiem Gitter aufgebaut, der einen Eingangswiderstand von 10^9 Ohm – gemessen bei 1 V Aussteuerung – hat und die Empfindlichkeit des Registriersystems nicht merkbar herabsetzt. Mit diesem Kathodenverstärker können Vorgänge erfasst werden, die nicht mehr durch direkten Anschluss eines Bariumtitanat-Gebers an einen gebräuchlichen Kathodenstrahloszillographen darstellbar sind (mehr als 10^{-4} s Dauer). Der Bariumtitanat-Geber mit einer Resonanzfrequenz von etwa 3 MHz (bei 1 mm Dicke) wird so für die Registrierung von Druckänderungen, die in Mikrosekunden bis Sekunden ablaufen, universell verwendbar.

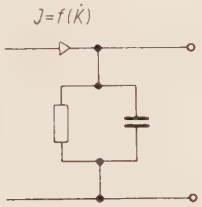


Abb. 1. Ersatzschaltbild des Bariumtitanat-Druckgebers.

Bariumtitanat ist ein kristallines, dichtes, keramisches Material. Es weist einen stark ausgeprägten elektrostriktiven Effekt auf (MASON[4]), das heisst, die bei Anlage einer Spannung erzielte Deformation ist unabhängig von der Polarität. Durch Polarisation im elektrischen Feld wird es piezoelektrisch. Die Polarisation kann mit einem 2–4%igen Bleizusatz und entsprechender Wärmebehandlung im elektrischen Feld permanent erhalten werden (SKUDRZYK[5]). Gegenüber anderen piezoelektrischen Substanzen hat Bariumtitanat mehrere Vorteile: Hohe Empfindlichkeit bei sehr grosser Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon = 1500$–5000), daher haben die Druckgeber auch bei kleinen Abmessungen relativ hohe Kapazitätswerte. Bariumtitanat ist völlig unhygroskopisch und unempfindlich gegen Feuchtigkeit, es verträgt höhere Temperaturen (Curie-Punkt bei 120° C). Bariumtitanat lässt sich, als keramisches Material, in jeder beliebigen Form herstellen.

Für die Verwendung als Druckgeber ist Bariumtitanat in Form von Scheibchen, die polarisiert sind und auf beiden Seiten einen Silberbelag eingebrannt haben, am zweckmässigsten. Zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften genügt das vereinfachte Ersatzschaltbild in Abbildung 1. Die gedachte Stromquelle liefert einen Strom, der eine Funktion der Ableitung des Druckes nach der Zeit ist; demnach erhält man, wie sich durch Integration zeigen lässt, die Elektrizitätsmenge als Funktion des Druckes. Durch diese Elektrizitätsmenge ist auch die an der Eigenkapazität erscheinende Klemmenspannung definiert. Die Eigenkapazität ist von den Abmessungen des Druckgebers abhängig und beträgt bei den üblichen Ausführungen (10–20 mm Durchmesser, 0,5–3 mm Stärke) einige nF. Der parallel liegende Widerstand ist 10^{11}–10^{12} Ohm, so dass die Eigenzeitkonstante (jene Zeit, in welcher eine aufgebrachte Ladung ohne Einwirken äusserer Einflüsse auf $1/e$ des ursprünglichen Betrages absinkt) 10^2–10^3 s erreicht. Andererseits erhält man bei direktem Anschluss an einen Kathodenstrahloszillographen mit einem Eingangswiderstand von 10^5–10^6 Ohm nur eine nutzbare Zeitkonstante von 10^{-4}–10^{-3} s. Der Eingangswiderstand muss im Ersatzschaltbild an den Ausgangsklemmen liegend – und damit parallel zum Innenwiderstand – gedacht werden.

Zur Anpassung des relativ niederohmigen Oszillographen an den äusserst hochohmigen Bariumtitanat-Geber erweist sich die sogenannte Kathodenverstärker- oder Anodenbasisschaltung mit freiem Gitter als geeignet (VALLEY und WALLMAN[6]). Die Gitterstromcharakteristik von Elektronenröhren macht es möglich, bei kleiner Aussteuerung einen ausserordentlich hohen Eingangswiderstand zu realisieren, indem auf einen Gitterableitwiderstand überhaupt verzichtet wird. Die Nullstelle der Gitterstromcharakteristik muss dabei in einem für die Aussteuerung der Röhre brauchbaren Gebiet liegen.

Es wurde eine Schaltung nach Abbildung 2 aufgebaut. Der erzielte Eingangswiderstand von 10^9 Ohm liegt bereits in der Grössenordnung von Isolationswiderständen. Es ist nicht sinnvoll, eine weitere Erhöhung des Eingangswiderstandes anzustreben, da auch die Widerstände der Halterung und der Zuleitungen kaum grösser sein können. Um beim Aufbau des Vorverstärkers den Eingangswiderstand nicht unnötig herabzusetzen, wurde die ältere Röhrentype AC 2 gewählt, die den Gitteranschluss am Glaskolben herausgeführt hat und damit eine ausgezeichnete Isolation des Gitters ermöglicht. Die Eingangsbuchse wurde auf Trolitul gesetzt und die Röhre staubdicht gekapselt, nachdem sich herausgestellt hatte, dass bereits erhöhte Luftfeuchtigkeit oder geringfügiger Staubniederschlag am Röhrenkolben den Isolationswiderstand wesentlich beeinträchtigen.

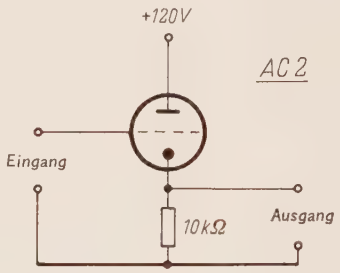


Abb. 2. Schaltung des Kathodenverstärkers mit freiem Gitter.

Abbildung 3 bringt eine Gegenüberstellung der Zeitkonstanten eines Registriersystems bestehend aus Bariumtitanat-Geber und Kathodenstrahloszillograph: *A* ohne Vorverstärker und *B* mit Vorverstärker gemäss Abbildung 2. Der scheibenförmige Geber war 3 mm stark und hatte 16 mm Durchmesser. Er wurde ringförmig auf einer Dose luftdicht gelagert und mit einer Überwurfmutter festgespannt. Die Empfindlichkeit der Anordnung betrug rund 2 V bei 1 atm Druckänderung. Wegen der besonderen Art der Halterung ist die Abhängigkeit der Spannung vom Druck nicht linear. Abbildung 3*A* wurde mit einem Philips-Kathodenstrahloszillographen GM 3156, Abbildung 3*B* mit einem Hickok-Kathodenstrahloszillographen Mod. 640 (mit eingebautem Gleichspannungsverstärker) aufgenommen.

[3] HJ. KOLDER, Naturwissenschaften *42*, 216 (1955); Sitz.-Ber. Akad. Wiss., Wien *165*, 357 (1957).

[4] W. P. MASON, *Piezoelectric Crystals and Their Application to Ultrasonics* (D. van Nostrand, N. Y. 1950).

[5] E. SKUDRZYK, *Die Grundlagen der Akustik* (Springer, Wien 1954).

[6] G. E. VALLEY jr. und H. WALLMAN, *Vacuum Tube Amplifiers* (McGraw-Hill, N. Y. 1948).

Die zu erwartende Zeitkonstante von etwa 10 s wurde mit dem Vorverstärker und 3 mm starkem Bariumtitanat, siehe Abb. 3 *B* – 8 s –, fast erreicht. Die Verwendung dünnerer Bariumtitanat-Scheibchen aus dem gleichen Material würde die Zeitkonstante verlängern.

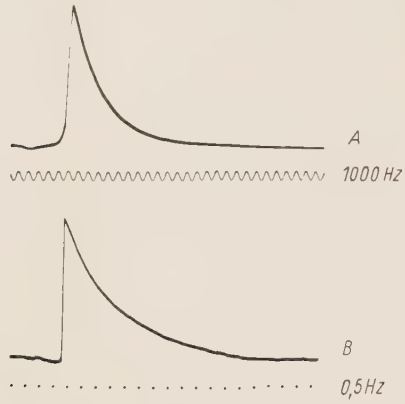


Abb. 3. Zeitkonstanten der Registriereinrichtung: *A* ohne Vorverstärker; *B* mit Vorverstärker.

Demnach lassen sich mit der beschriebenen Anordnung und geeignet dimensioniertem Bariumtitanat-Geber Druckänderungen bis zu einer Sekunde Dauer mit einem Fehler von höchstens 10% registrieren. Steht ein Verstärker genügender Empfindlichkeit zur Verfügung oder sind die Druckänderungen gross, so kann eine Parallelkapazität zur kapazitiven Spannungsteilung verwendet werden. Diese verlängert die Zeitkonstante des Registriersystems im gleichen Verhältnis, wie sie die Spannung herabsetzt. Eine Beeinflussung des Frequenzganges tritt dadurch, wie aus dem Ersatzschaltbild zu entnehmen ist, nicht ein. Zu hohe Spannungen, über 10 V, würden den Eingangswiderstand des Vorverstärkers herabsetzen.

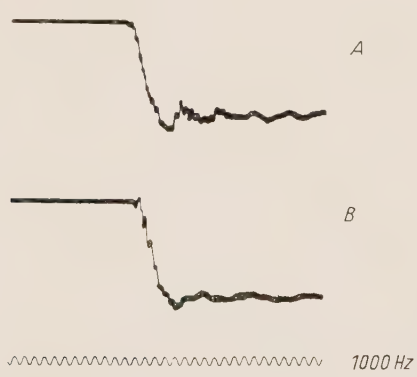


Abb. 4. Druckänderung bei explosiver Dekompression: *A* Bariumtitanat-Geber mit Vorverstärker; *B* Bariumtitanat-Geber mit Vorverstärker und Parallelkapazität.

In Abbildung 4 sind zwei Dekompressionskurven dargestellt, die einer Druckdifferenz von 0,7 atm entsprechen. Abbildung 4*A* wurde nur mit Bariumtitanat-Geber und Vorverstärker, Abbildung 4*B* mit einer zusätzlichen Parallelkapazität von 10 nF aufgenommen. Die Kurven entsprechen einander bis auf geringe Differenzen, die in den Dekompressionsvorgängen selbst begründet sind.

H. Huber und Hj. Kolder

Institut für Niederfrequenztechnik der Technischen Hochschule in Wien und Physiologisches Institut der Universität Wien, den 9. November 1956.

Summary

The properties and advantages of barium titanate transducers for pressure registrations have been described. If the rate of pressure change is less than 10^{-3} s a barium titanate transducer with a cathode ray oscilloscope as commonly used is sufficient. Pressure changes with a duration of up to 1 s can be recorded by means of a barium titanate transducer, cathode follower with open grid, and D.C. oscilloscope. This arrangement can be adapted to the registration of processes of even longer duration by a shunt capacity. The sensativity of the transducer used was in the order of 2 V per 1 atm.

PRO EXPERIMENTIS

A Contribution to the Evaluation of the Glucose Tolerance Test

In recent years several authors have begun administering glucose intravenously instead of *per os*, even in clinical practice, in order to determine the carbohydrate tolerance. There are several ways of evaluating the result of intravenous glucose tolerance test: (1) the hyperglycaemic peak attained and the return to the fasting value[1], (2) the value of the blood sugar at a given interval after the end of the injection[2], (3) the time taken for the blood sugar to regain the fasting value[3] or the time taken to reach a definite pre-determined value[4], (4) the glucose assimilation coefficient[5], rate of disappearance of the glucose[6], total or increment index[7], (5) the areas under the observed curves[8], (6) the quantity of sugar utilised per 1 h[5], (7) the clearance of glucose suggested by Hoenig[9]. The formula he proposes for the glucose clearance does not take into account the initial phase of rapid decline and presumes that the blood sugar level during the course of the glucose tolerance test is maintained at the fasting value. In the present work we propose an altered form of the equation for the calculation of clearance of glucose.

Method. The glucose tolerance test was performed on 13 healthy adults and 39 ambulant patients. On the night before the test 50 g of glucose were administered *per os* for compensating for inequalities in the diet[10]. The following morning the sample of blood was taken and 25 g of glucose were injected intravenously in a 40% solution of distilled water during 2½ to 4 min. Blood samples were drawn from the finger in 5, 10, 20, 30, 45,

[1] G. G. Duncan, *Diseases of metabolism*, III. Ed. (Philadelphia 1953). – A. Cantarow and M. Trumper, *Clinical Biochemistry* (Philadelphia 1949).

[2] E. L. Lozner, A. W. Winkler, F. H. L. Taylor, and J. P. Peters, J. clin. Invest. *20*, 507 (1941).

[3] E. R. Tunbridge and E. C. Allibone, Quart. J. Med. *9*, 11 (1940).

[4] T. Crawford, Arch. Dis. Child. *13*, 69 (1938).

[5] V. Conard, *Mesure de l'assimilation du glucose* (Bruxelles 1955).

[6] D. S. Amatuzio, F. I. Stutzman, J. M. Vanderbilt and S. Nesbit, J. clin. Invest. *32*, 428 (1953). – G. D. Greville, Biochem. J. *37*, 17 (1943). – J. J. Waller, S. H. Stribling and Ch. L. Spur, J. lab. clin. Med. *44*, 647 (1954).

[7] L. J. P. Duncan, Quart. J. exp. Physiol. *41*, 85 (1956).

[8] S. Jörgensen, Acta med. Scand. *65*, 116 (1926–1927). – C. W. Ross, Arch. Dis. Child. *13*, 289 (1938).

[9] V. Hoenig, Čas. lék. čes. *95*, 122, 1015 (1956).

[10] T. N. Burns, F. L. Engel, E. Werk, A. Viav, J. L. Scott, and D .R. Hollingsworth, J. clin. Invest. *32*, 781 (1953). – J. A. Mirski, S. M. Kaplan, C. J. Podove, and R. H. Bron-Kahn, J. clin. Invest. *29*, 297 (1950).

60, 75, 90 min intervals and blood sugar was determined according to our own modification of the anthrone method[11]. In the 60th and 120th min urine was collected for the determination of sugar by the anthrone method. During the whole procedure the patients remained in a recumbant posture. When blood sugar concentration was plotted against time on semilogarithmic paper, a straight line was obtained (Fig. 1).

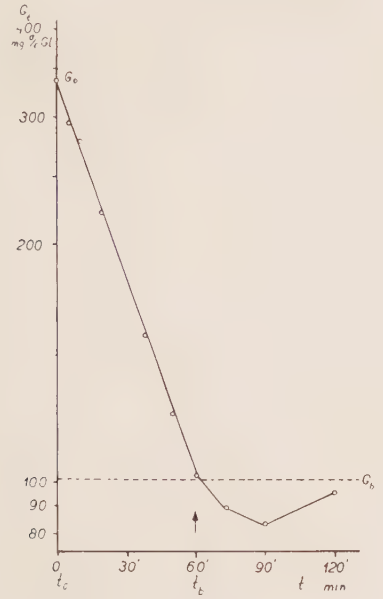


Fig. 1.—The decline of concentration of the blood sugar plotted against time on semilogarithmic paper. G_0 is the blood sugar level at the end of the injection. G_b is the fasting value, t_b the time in which the blood sugar regains the fasting level.

Results. In evaluating our tolerance tests by means of clearance values we were guided by the following consideration. In the organism the volume V at the fasting level G_b contains $V \cdot G_b$ of glucose. After administering intravenously a quantity I of glucose there is in the whole organism $I + V \cdot G_b$ of glucose at the end of the injection. Since SOSKIN[12], BONDY[13] have shown that there is no output of sugar from the liver after a dose of glucose (Fig. 2) and therefore the level G_b does not remain constant as is presumed in the formula proposed earlier, the quantity $I + V \cdot G_b$ is utilized by tissues of the whole organism and the glucose concentration level declines according to the exponential equation[5]

$$G_t = G_0 e^{-kt} \tag{1}$$

where G_t is the blood sugar level in the time t, G_0 is the blood sugar value in the time $t_0 = 0$, K the rate of disappearence of the glucose. This relation holds up to the moment the liver starts anew to give out sugar, that is to say approximately the moment when the concentration falls to G_b during time t_b (Fig. 2). Then the quantity of glucose in the organism will be again $V \cdot G_b$.

$$V \cdot G_b = I + V \cdot G_b - Qv \tag{2}$$

where Qv is the quantity of glucose utilized during the time t_0–t_b.

$$Qv = V \int_{t_0}^{t_b} dG = V \cdot (G_0 - G_b). \tag{3}$$

By inserting (3) into the equation (2) we have

$$I = V \cdot (G_0 - G_b). \tag{4}$$

The formula for Cl defined by NEWMAN[14], LEWIS[15], NAVA[16] is:

$$Cl = 2{,}303 \cdot V \cdot \frac{\log_{10} G_0 - \log_{10} G_b}{t_b - t_0} = V \cdot K \tag{5}$$

where K is the rate of disappearence of the substance studied[17], which is obtained by expressing the equation (1) logaritmically. By combining equation (4) with (5) we get the final formula

$$Cl = \frac{I \cdot K}{G_0 - G_b} \text{ ml/min} \tag{6}$$

where I is the quantity of glucose given minus the quantity of glucose excreted by urine in 60 min, which time represents the average of declines to the fasting value. G_0 is the blood sugar level in the time t_0 obtained by extrapolating the straight line, G_b is the fasting blood sugar value, K is the rate of disappearence of glucose[18] and $K = \log_e 2/t_h$ where t_h is the time in minutes required for the blood glucose value G_0 at any point to be halved.

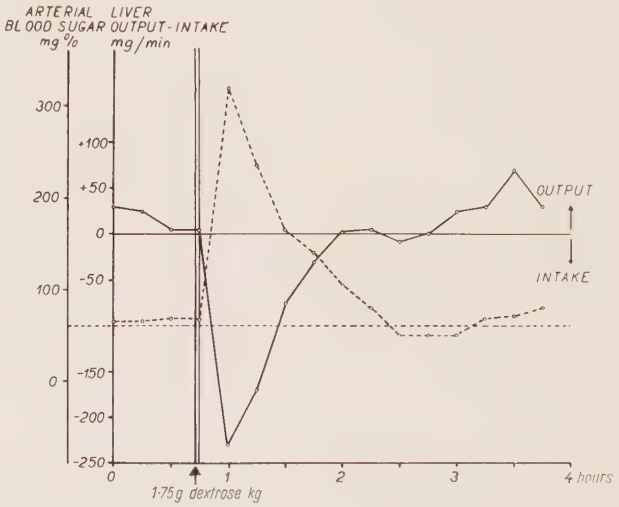


Fig. 2.—The effect of dextrose administration upon the output and intake of sugar by liver of an intact dog, calculated from blood sugar values and thermostromuhr measurements of hepatic blood flow. The broken line represents arterial blood sugar values; the heavier, continuous line represents output or intake of sugar by the liver in milligrams per minute (SOSKIN *et al.*[19]).

In support of the use of the above formula (4) as substitute for the volume, we point to the findings of Co-

[11] L. MACHO, Brat. lek. listy (in press).

[12] S. SOSKIN and R. LEVINE, *Carbohydrate metabolism* (Chicago 1952). – S. SOSKIN, H. E. ESSEX, J. F. HERRICK, and F. C. MANN, Amer. J. Physiol. *120*, 761 (1937).

[13] P. K. BONDY, D. F. JAMES, and B. W. FARRAR, J. clin. Invest. *28*, 238 (1949).

[14] E. V. NEWMAN, J. BORDLEY, and J. WINTERNITZ, Johns Hopk. Hosp. Bull. *75*, 244 (1944).

[15] G. NAVA and P. CAMPA, Riv. Gastro-enterol. *2*, 75 (1950).

[16] A. E. LEWIS, Amer. J. clin. Pathol. *18*, 789 (1948).

[17] V. CONARD, *Mesure de l'assimilation du glucose* (Bruxelles 1955). – D. S. AMATUZIO, F. I. STUTZMAN, J. M. VANDERBILT, and S. NESBIT, J. clin. Invest. *32*, 428 (1953). – G. D. GREVILLE, Biochem. J. *37*, 17 (1943).– V. HOENIG, Čas. lék. čes. *95*, 122, 1015 (1956).

[18] V. CONARD, *Mesure de l'assimilation du glucose* (Bruxelles 1955). – D. S. AMATUZIO, F. I. STUTZMAN, J. M. VANDERBILT, and S. NESBIT, J. clin. Invest. *32*, 428 (1953). – G. D. GREVILLE, Biochem. J. *37*, 17 (1943). – L. J. P. DUNCAN, Quart. J. exp. Physiol. *41*, 85 (1956). – V. HOENIG, Čas. lék. čes. *95*, 122, 1015 (1956).

[19] S. SOSKIN, H. E. ESSEX, J. F. HERRICK, and F. C. MANN, Amer. J. Physiol. *120*, 761 (1937).

NARD[5] who compared the extracellular volume calculated from the course of the glucose tolerance test and by the SCN method and arrived at similar results. We evaluated our own intravenous glucose tolerance tests and those from literature[20] by means of the new and by HOENIG's method as well. The values of *Cl* were plotted against *K*. A better correlation was found between *K* and *Cl* as determined by the new formula (Fig. 3). The values of *Cl* also depend on the volume of distribution,

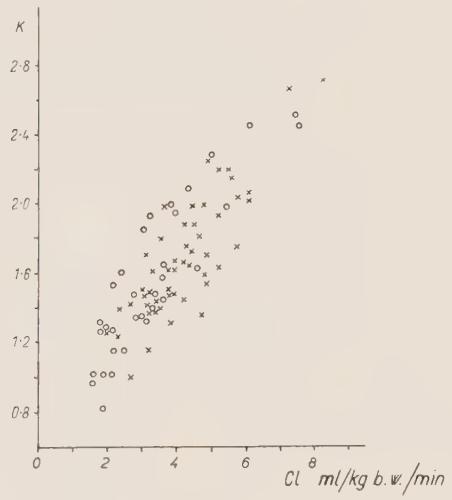


Fig. 3.—The clearance of glucose is plotted against the rate of disappearance $K \times 10^2$.

are inversely proportional to the time in which the blood sugar value declines to the fasting level and to the $\log_e$ of the concentration found after 60 min. The average value $K \times 10^2$ of healthy adults, similary as in CONARD's series[5] is 1·69 ± 0·27, the mean values for *Cl* are: Cl_{total} 220·56 ± 54·9 ml/min and for unit of weight 3·29 ± 0·92 ml/min/kg b.w.

L. MACHO, V. LICKO

Endocrinological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia, November 20, 1956.

Zusammenfassung

Es wird eine abgeänderte Formel für die Berechnung der Glukose-Clearance nach intravenöser Applikation vorgeschlagen.

Das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Clearancewerte bei Gesunden betragen 220,56 ± 54,9 ml/min, das heisst 3,29 ± 0,92 ml/min/kg Körpergewicht.

[20] V. CONARD, *Mesure de l'assimilation du glucose* (Bruxelles 1955). – D. S. AMATUZIO, F. I. STUTZMAN, J. M. VANDERBILT, and S. NESBIT, J. clin. Invest. *32*, 428 (1953).

PRO EXPERIMENTIS

The Determination of Volatile Aldehydes in Gases and Vapours

In the analysis of gaseous mixtures, a very accurate process is seldom necessary to determine volatile aldehydes such as acetaldehyde, propionaldehyde, and n-butyraldehyde. The present note gives a very precise method, as far as we know not yet described in the chemical literature, for the determination of such vapours in presence of volatile saturated and unsaturated hydrocarbons, carbon dioxide, carbon monoxide, oxygen and nitrogen, using an Orsat apparatus. The process consists in bubbling the mixture of gases through an absorption solution described below.

The experiments necessary to determine the selectivity absorption of the aldehydes were made in the following manner:

Liquid acetaldehyde, propionaldehyde or butyraldehyde, distilled with a fractional distillation column with fourty theoretical plates, were introduced into a gas sampling pipette, filled with clean and dry mercury. The level of mercury can be lowered by lowering the bulb attached to the inferior part of the pipette, thus vaporizing the aldehyde.

The pure aldehyde vapour was then introduced into the volumetric burette of the Orsat apparatus, its volume read at atmospheric pressure and then the other gases were introduced under the same conditions and their volumes recorded.

The known volume of the gaseous mixture was then bubbled several times through the solution below proposed for aldehydes absorption, until the difference between two volumes determinations was equal to the experimental error. Usually only 4 to 5 slow passages each involving 3–5 min are necessary.

After the absorption of the aldehyde, the residual mixture is passed through other absorption solutions in order to effect the selective absorption of the other gases. The preparation and composition of the absorption solutions that we have used are well described by BURKE, STARR, and TUEMMLER in their book[1].

The results obtained with mixtures containing from zero to 50% in volume of acetaldehyde, zero to 32% in volume of propionaldehyde and zero to 6% in volume of butyraldehyde, were very good, given results affected always with errors less than ± 0,1.

In all the experiments the absorption mixtures were previously saturated with the gases analyzed, as is commonly done in the gas analysis technique. Besides these experiments, we studied the absorption of the following gases mixed with air and found total recovery of them. Gases tested:

CH_4, C_2H_6, C_3H_8, C_2H_4, C_3H_6, C_2H_2, CO_2, CO, N_2, H_2 and O_2.

Preparation of the absorption solution.—15 g of 98% sulfuric acid were dissolved in 220 ml of a saturated solution of sodium sulfate (at 20°C), and 46 g of chromium trioxide were then introduced. The orange-red solution so obtained is ready for use after the necessary saturations.

R. CIOLA

Physical and Chemical Department of the Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, São Paulo, Brazil, December 3, 1956.

Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode vorgeschlagen, Acetaldehyd, Propionaldehyd und Butyraldehyd in Gegenwart von CH_4, C_2H_6, C_3H_8, C_2H_4, C_3H_6, C_2H_2, CO_2, CO, N_2, H_2 und O_2 quantitativ zu bestimmen. Die Methode besteht darin, das Gasgemenge mit Hilfe eines Orsatschen Apparates durch eine bei 20°C gesättigte, Chromtrioxyd und Schwefelsäure enthaltende Natriumsulfatlösung zu schicken, welche die oben genannten Aldehyde selektiv absorbiert.

[1] O. W. BURKE, C. E. STARR, and F. D. TUEMMLER, *Light hydrocarbon analysis* (Rheinhold Publ. Co., New York 1951), Method LH-302–304.

[2] Present address: Chemistry Department, Northwestern University, Evanston (Illinois).

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

The Integumental Pigment of *Asellus*

By A. E. Needham and P. C. J. Brunet*

The body-pigment of the isopod crustacean *Asellus aquaticus* Linn., usually considered to be a melanin, is known to turn red after death[1]. This colour-change also occurs after certain chemical treatments[2]. We have noticed, further, that the post-mortem red colour becomes brown once more on exposure to air, the colour-change being a reversible oxidation-reduction reaction. This change resembles the behaviour of xanthommatin[3], the best known of the 'ommochromes'—shown to be a group of phenoxazone-pigments. This resemblance has been further investigated.

Experimental.—Specimens of *Asellus* were obtained in quantity from local waters, and after washing were finely ground. The carotenoids[2] were removed by grinding with repeated changes of acetone. Material prepared in this way was used immediately for extraction of the body-pigment, which deteriorates in stored material. It was most readily extracted with methanolic HCl (methanol containing 1% HCl weight/volume); but 1% (W/V) aqueous HCl was generally used, since it permitted easier precipitation of the reduced form of the pigment, subsequently, for purposes of purification. The calcium carbonate of the exoskeleton was dissolved out in the process, neutralising some of the acid, and the pigment could therefore be obtained in a very weakly acid solution. Proteins were removed by shaking the extract with a 9:1 mixture of chloroform and amyl alcohol.

A sample of xanthommatin, kindly supplied by Prof. Butenandt, was available for comparison.

Results.—Chemical Properties.—The solution of the pigment, in 1% aqueous or methanolic HCl, golden in colour, turned pink on reduction with sodium dithionite, sulphur dioxide and other reducing agents, provided the pH was adjusted to the range 4–6, by dilution or partial neutralization. A fine precipitate formed, aggregating slowly to a brilliant crimson flock, and leaving a colourless supernatant. In more concentrated acid the colour remained a deep tangerine and no precipitate was formed. The crimson precipitate was resoluble in methanolic HCl and in phosphate buffers of pH 7·0 or higher. The pigment reoxidized in the process, and in alkaline phosphate it bleached rather rapidly to a pale yellow pigment, which no longer had redox properties. These properties compare closely with those of xanthommatin[3].

Some of the pigment was extracted by water alone, from homogenized material, and considerable amounts by 10% (W/V) aqueous urea, and by ethylene chlorhydrin[4].

Crystals formed, on standing, in solutions of the pigment, redissolved in methanolic HCl after precipitation

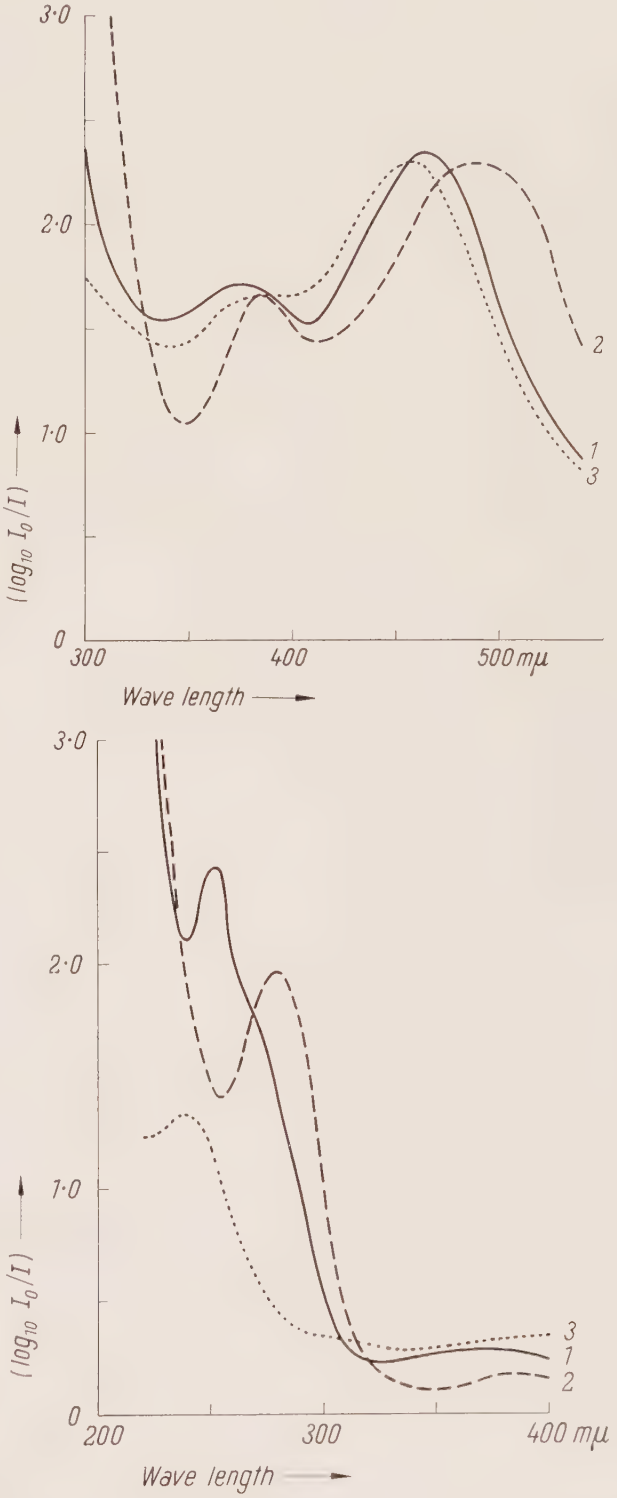


Fig. 1.—Absorption spectra of (*1*) oxidized form in N–HCl and (*2*) reduced form in amyl alcohol, of the ommochrome of *Asellus*-integument, and (*3*) of xanthommatin (Butenandt) in 0·1N–HCl.

A-Range: 300–500 mμ; *B*-Range: 200–400 mμ; solutions diluted 6 × with the solvent.

* Department of Zoology and Comparative Anatomy, University of Oxford.

[1] C. J. von Kaulbersz, Zool. Jb., Abt. allg. Zool. Physiol. *33*, 287 (1913).

[2] E. Baldwin and R. A. Beatty, J. exp. Biol. *18*, 136 (1941).

[3] A. Butenandt, U. Schiedt, E. Biekert, and P. Kornmann, Liebigs Ann. Chem. *586*, *217* (1954a).

[4] A. J. Lea, Nature *156*, 478 (1945).

in the reduced form. These were birefringent, berry-like clusters of sherry-brown crystals, similar to those described by Butenandt *et al.*[3], and were resoluble on addition of more methanolic HCl.

Absorption spectra.—The absorption-spectra of the oxidized and reduced pigment, in normal aqueous HCl and in amyl alcohol respectively, are recorded in Figure 1. The oxidized form had absorption-maxima at 250, 380, and 465 mμ, and the reduced form at 280, 385, and 490 mμ. The relative magnitudes of the three peaks and their approximate positions compare with those of xanthommatin (Fig. 1)[3] and of other pigments with similar chemical properties[5]. The precise positions vary somewhat in different ommochromes[6], and they also vary with the nature of the medium.

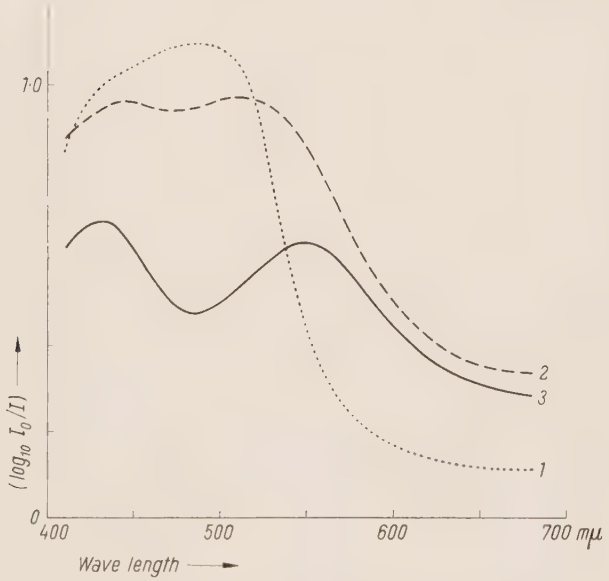


Fig. 2.—Absorption spectra, in the visible range, of *Asellus*-ommochrome in different concentrations of H_2SO_4: (1) 10%, (2) 55%, (3) 77·5%.

Thus the position of the absorption-maximum of the oxidized *Asellus*-pigment, in the visible region of the spectrum, was moved to a progressively longer wave-length by increasing concentrations of HCl, and the colour of the solution became more orange. On the contrary the presence of methanol in the solvent caused a shift of the maximum towards a shorter wave-length, and the solution became more lemon-yellow.

The pigment was also extracted by dilute sulphuric acid of 4% initial concentration. With increasing concentration of this acid the colour of the solution showed the same reddening, and shift in spectral absorption, as that in HCl. In concentrations of sulphuric acid greater than 40%, a violet colour was detectable (the 'halochromie' of Becker[7], and this completely replaced the orange-red colour at a concentration of 70% H_2SO_4. Figure 2 shows the absorption spectra, in the visible range, of the pigment in increasing concentrations of H_2SO_4. The single peak at 465 mμ was replaced by two peaks, respectively at a shorter and at a longer wave-length[8] and these moved progressively farther apart as the concentration of acid was increased. Solutions in concentrated sulphuric acid changed, in one to two days to a dark brown colour, and the absorption spectrum then showed no peaks in the visible range.

Chromatography.—No completely satisfactory solvent-mixture for partition paper chromatography was devised. Collidine saturated with $M/2$ KH_2PO_4[3], was tried, but in it both the *Asellus*-pigment and xanthommatin faded badly. Aqueous solutions of urea, and of sodium dihydrogen phosphate, either alone, or mixed, were found to be fairly satisfactory. The best results were obtained using Whatman 3MM paper with 0·05 M NaH_2PO_4, in which the R_F value of xanthommatin was 0·23, and with a 0·05 M NaH_2PO_4 solution containing 5 M urea, in which the R_F value was 0·61. The *Asellus*-pigment moved chromatographically very like xanthommatin, and the main yellow spot of both chromatogramms was reversibly reduced by SO_2-vapour to the crimson form.

Alkaline Hydrolysis.—The *Asellus*-pigment showed the same reactions as xanthommatin when hydrolyzed with alkali. As it dissolved in N–NaOH, it was rapidly bleached but, after heating for 2 h on the water-bath had become a deeper yellow. The solution was then acidified with HCl to pH 3, and shaken with *n*-butanol. The upper phase was washed with 0·1N–HCl, and applied, with concentration, to Whatman No. 1 paper for partition-chromatography, using as solvent the upper phase of a mixture of *n*-butanol, acetic acid and water in ratio 4:1:5. After chromatography, three areas fluorescent in U.V., were apparent on the paper: a streak of R_F value 0·05 to 0·35, a well marked spot, R_F 0·56, which fluoresced blue, and a larger spot, R_F 0·90. Such a pattern of spots was obtained by Butenandt *et al.*[9] by chromatography of hydrolyzed xanthommatin. The two faster-moving spots were common also to alkaline hydrolysates of rhodommatin and of 3-hydroxykynurenin, a precursor of the ommochromes. The spot of R_F value 0·56 was considered to represent xanthurenic acid, a degradation-product of xanthommatin and other phenoxazones[10].

Discussion.—*Xanthommatin* has been isolated from two sources[11], fully characterized and synthesized. Certain pigments in other animals[12] are very similar though possibly not identical[6]. The integumental pigment of *Asellus* clearly belongs to this group.

Acid methanol eventually extracts all the colour from the integument of *Asellus*, and there is no reason to believe that, when fresh, the solution contains significant amounts of other pigments. Goodwin and Srisukh[8] and Schwink[13], also believed that they were dealing with a single native pigment, the latter notwithstanding the variety of colour among the chromatophores o

[5] T. W. Goodwin and S. Srisukh, Biochem. J. *47*, 549 (1950). – L. Schwinck, Naturwissenschaften *40*, 365 (1953); Zool. Anz. *19*, Supplementband, 71 (1956).

[6] I. Schwinck, Zool. Anz. *19*. Supplementband, 71 (1956).

[7] E. Becker, Naturwissenschaften *29*, 237 (1941).

[8] T. W. Goodwin and S. Srisukh, Biochem. J. *47*, 549 (1950).

[9] A. Butenandt, U. Schiedt, and E. Biekert, Liebigs Ann. Chem. *586*, 229 (1954b).

[10] A. Butenandt, U. Schiedt, and E. Biekert, Liebigs Ann. Chem. *586*, 229 (1954b). – A. Butenandt, U. Schiedt, E. Biekert and R. J. T. Cromartie, Liebigs Ann. Chem. *590*, 75 (1954c).

[11] A. Butenandt, U. Schiedt, E. Biekert, and P. Kornmann, Liebigs Ann. Chem. *586*, 217 (1954a). – A. Butenandt, U. Schiedt and E. Biekert, Liebigs Ann. Chem. *586*, 229 (1954b). – A. Butenandt and G. Neubert, Z. physiol. Chem. *301*, 109 (1955).

[12] B. Ephrussi and J. L. Herold, Genetics *29*, 148 (1944). – G. Wald and G. Allen, J. gen. Physiol. *30*, 41 (1946). – W. K. Maas, Genetics *33*, 177 (1948). – T. W. Goodwin and S. Srisukh, Biochem. J. *47*, 549 (1950). – I. Schwinck, Naturwissenschaften *40*, 365 (1953).

[13] I. Schwinck, Naturwissenschaften *40*, 365 (1953).

Sepia. However two other pigments appeared in aged extracts of the *Sepia* pigment; one was identified[6] with rhodommatin, a second ommochrome extracted by Butenandt *et al.*[3] from the excreta of *Vanessa*. Goodwin and Srisukh[8] produced a pigment with similar properties on extraction of locust tissues with N–NaOH. On standing a similar material appears also, in solutions or suspensions of both reduced and oxidized forms of the *Asellus*-pigment. This artefact is a dark red-brown substance, stable in alkali (thus unlike xanthommatin), soluble in phosphate buffers of pH 7·0 or higher, and precipitable by HCl at pH 2·0. It does not show the easily reversible redox colour-change of xanthommatin, but is oxidized to a yellow solution by such strong oxidizing agents as hydrogen peroxide and sodium nitrite[6]. A further artefact, of a purple to violet colour, was regularly produced. It became firmly bound to the 'flesh' of *Asellus* during extraction of the pigment from the chromatophores, and to filter papers during filtration. It had certain of the properties of ommatin C[3].

Although in *Asellus* there appears to be only the one native pigment, in the terrestrial isopod, *Porcellio scaber*, there is, in addition to the xanthommatin-like pigment, another which is also extracted as a yellow solution by methanolic HCl, but has no redox properties. *Porcellio* has both brown and golden chromatophores but these do not appear to correspond respectively to the two pigments extracted, since both cells are reduced to the same crimson colour, just as the pigments of the three chromatophores of *Sepia*[13]. Howard[14] concluded that the two differently coloured chromatophores of another woodlouse, *Armadillidium vulgare*, are due to distinct pigments, and both this and the polychromatism of *Jaera* (Bocquet[15]) merit further investigation. The overall colour of woodlice is not entirely due to their integumentary pigment. Although the overlying exoskeleton is quite colourless, notwithstanding the statements of Kaulbersz[6], it is probably responsible for the bluish tinge (Tyndall effect) of thick shelled forms such as *Porcellio* and *Armadillidium*. Again, the red of *Androniscus* is due mainly to a pigment in the body-fluid; hydrogen peroxide does not oxidize this pigment to a yellow colour, so that it may not be an ommochrome[6].

Becker[7] had already given some indication of the widespread occurrence of ommochromes in the integument and eyes of arthropods, and the known range of distribution has since been considerably extended. We have found the xanthommatin-like pigment also in the integument of the marine isopod, *Ligia* and the myriapod *Julus scandinavius*.

Previously the body-pigment of *Asellus*[16] and of *Sepia*[13] and other ommochrome pigments[17] have been included among the 'melanins', golden to black pigments, occurring usually as intracellular granules, relatively insoluble in organic solvents, and in acids, capable of reducing silver nitrate, and being bleached by strong oxidizing agents[18]. Such properties could apply to substances differing widely in chemical composition, and of different metabolic origin; and, in fact, they did not distinguish between the ommochromes and the melanins of vertebrates, which have different chemical properties and are probably polymerized oxidation products of dopa[19]. Mason has given a biochemical definition of melanins which could include both: '... pigments of high molecular weight formed by enzymic oxidation of phenols.' This may be taken to include, as well as 'dopa'-melanins, pigments derived from 3-hydroxykynurenin (the ommochromes), and perhaps such pigments as the 'phaeo-melanin' of Foster[20]. It seems possible, indeed, that the phenolase complex which produces dopa-melanin[21] may actually catalyse the production of ommochrome pigments: for instance, melanin is deposited from solutions of dopa in developing chromatophores of *Asellus*[22], and insect-tyrosinase catalyses the production of pigment in albino woodlice[23]. Arthropods, including those which produce ommochromes, also have more inert dopa-type melanins in the blood[24], digestive fluids and elsewhere. The ink of *Sepia* also is more inert[6]. Indeed, recently Butenandt *et al.*[25] have shown not only that tyrosinase will catalyse the synthesis of xanthommatin, *in vitro*, but also that dopa and other intermediaries of the dopa-melanin series promote the reaction. Dopa-melanin also is formed in the reaction mixture. Inagami[26] suspects that the two pigments may be mixed in various proportions *in vivo*, and it is possible that such properties of natural melanins as solubility in ethylene chlorhydrin[4] may be due to ommochrome components.

Our great thanks are due to Prof. A. Butenandt for the gift of a sample of xanthommatin, and to Prof. H. A. Krebs and members of his staff, for facilities and help in the use of ultraviolet spectrophotometers.

Résumé

La mélanine intégumentaire du crustacé isopode, *Asellus*, est un pigment ommochrome, avec des propriétés très semblables à celles de la xanthommatine. Ce pigment existe aussi dans l'intégument de *Porcellio* et d'autres isopodes, ainsi que du myriapode *Iulus*.

[14] H. W. Howard, J. Genetics *51*, 259 (1952).

[15] C. Bocquet, Arch. Zool. exp. gen. *90*, 187 (1953).

[16] E. Baldwin and R. A. Beatty, J. exp. Biol. *18*, 136 (1941). – A. E. Needham, Nature *164*, 177 (1949).

[17] A. Butenandt, U. Schiedt, E. Biekert, and P. Kornmann, Liebigs Ann. Chem. *586*, 217 (1954a). – E. Becker, Naturwissenschaften *29*, 237 (1941).

[18] L. Lison, *Histochimie et Cytochimie Animales* (Gauthier-Villars, Paris 1953).

[19] H. S. Mason, in *Pigment-Cell Growth* (Ed. M. Gordon, N. Y., Academic Press 1953), p. 277.

[20] M. Foster, J. exp. Zool. *117*, 211 (1951).

[21] H. S. Mason, Adv. Enzymol. *16*, 105 (1955).

[22] A. E. Needham, Nature *164*, 177 (1949).

[23] J. de Lattin, Zool. Anz. *125*, 309 (1939).

[24] K. G. Pinhey, J. exp. Biol. *7*, 19 (1930).

[25] A. Butenandt, E. Biekert, and B. Linzen, Z. physiol. Chem *305*, 284 (1956).

[26] K. Inagami, Nature *174*, 1105 (1954).

STUDIORUM PROGRESSUS

Über den Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone

Von H. J. Hübener*

Es ist heute möglich, praktisch alle Ausfallserscheinungen der Nebennierenrindeninsuffizienz mit chemisch bekannten Stoffen[1] zu beseitigen, ohne dass hierbei der Blutdruck pathologisch ansteigt oder die Elektrolyte des Organismus in Unordnung geraten. Diese Tatsache macht es wahrscheinlich, dass die chemische Konstitution der wichtigsten Wirkstoffe der Nebennierenrinde (NNR) aufgeklärt ist. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich der Schwerpunkt des biochemischen Interesses in der letzten Zeit von der chemischen Aufklärung auf die enzymatischen Umsetzungen der NNR-Hormone verlagert hat. Über diesen Stoffwechsel der NNR-Hormone inner- und ausserhalb der endokrinen Drüsen wird im folgenden berichtet.

Beginnen wir mit der *Biosynthese*. Der Genius der Natur kommt mit sehr wenigen Enzymreaktionen aus, um Steroidhormone mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen zu bilden. Aus dem Progesteron entsteht durch eine 21-Hydroxylase das einfachste wirksame NNR-Hormon Desoxycorticosteron, durch die oxydative Abspaltung der Seitenkette vom Progesteron Testosteron und schliesslich durch Aromatisierung des *A*-Ringes Östradiol.

Die steroidhormonproduzierenden Drüsen sind qualitativ mit einem ähnlichen Enzymsatz ausgestattet. So können Testes, Ovarien und die NNR Östrogene und Androgene synthetisieren. Die charakteristische Eigenschaft einer jeden Drüse ist im wesentlichen nur durch quantitative Unterschiede ihrer Enzymausstattung bedingt.

Nur die NNR hat noch einige Enzymsysteme den Ovarien und Testes voraus, nämlich die Enzyme, die Steroide am C-Atom 11,18 und 21 oxydieren. Diese sind durch fettgedruckte Pfeile in Abbildung 1 hervorgehoben.

Ob die 17α-Oxydation auch zu den nebennierenrindenspezifischen Enzymreaktionen gehört, ist noch nicht sicher. Einerseits wurden meines Wissens keine 17α-Oxy-C_{21}-Steroide aus den Ovarien und Testes isoliert, andererseits scheint aber die Abspaltung der Seitenkette von C_{21}-Steroiden durch die Einführung einer 17α-Oxy-Gruppe eingeleitet zu werden[2]. Es sei noch erwähnt, dass die Plazenta vielleicht auch diese nebennierenrindenspezifischen Oxygenierungen vermitteln kann, da gravide Frauen sehr hohe Mengen an 11- und 21-Stellung oxygenierter NNR-Hormone ausscheiden[3]. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind meines Wissens noch nicht in der Plazenta nachgewiesen worden.

Die 11β-Oxydation. Zunächst darf ich auf die erste dieser für die NNR typischen Umwandlungen, nämlich die 11β-Oxydation, näher eingehen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die 11β-Oxydation von Steroiden durch die NNR-Mitochondrien vermittelt wird[4]. Kürzlich wurde nun von einer englischen und amerikanischen Arbeitsgruppe[5] unabhängig voneinander überraschenderweise TPNH als Cofaktor bei dieser Oxydation entdeckt. Wenn nämlich NNR-Mitochondrien in Gegenwart von TPNH mit DOC bebrütet werden, so wird innerhalb einer Stunde praktisch alles DOC in Corticosteron überführt. TPN, DPNH und DPN allein sind unwirksam, dagegen ist die Kombination von TPN und DPNH ebenfalls wirksam, weil in der NNR eine Transhydrogenase enthalten ist, die den Wasserstoff von DPNH auf TPN überträgt.

Wie das reduzierte TPN in die 11β-Oxydation eingreift, beginnt sich in letzter Zeit durch die Arbeiten von Hayano *et al.*[6] sowie von anderen Autoren[7] abzuzeichnen.

Danach liefert TPNH lediglich die Energie, die nötig ist, um Sauerstoff an einen Akzeptor (Acc) anzulagern. Der Akzeptor gibt dann den aktivierten Sauerstoff an das Substrat weiter. Am Beispiel der Oxydation des Phenylalanins zu Tyrosin konnten schliesslich zwei Enzyme wahrscheinlich gemacht werden[8].

$$\mathrm{TPN\sim H + O_2 + Acc \xrightarrow{E_1} TPN + [AccOOH]}$$

$$\mathrm{[AccOOH] + Steroid\text{–}H + H^+ \xrightarrow{E_2} Steroid\text{-}OH + Acc + H_2O}$$

$$\mathrm{TPN\sim H + O_2 + Steroid\text{-}H + H^+ \xrightarrow{E_1 \text{ u. } E_2} TPN + H_2O + Steroid\text{-}OH}$$

Diese Formulierung erklärt am besten die experimentellen Befunde, wonach der Sauerstoff der Atmosphäre direkt zur 11β-Oxydation verwendet wird[9] und das reduzierte TPN obligater Cofaktor ist. Die Anlagerung von Wasser an eine Doppelbindung, wie wir sie bei der Umwandlung von Fumarsäure zur Apfelsäure beobachten, konnte für die 11β-Oxydation ausgeschlossen werden[10].

Auch die 17- und 21-Oxygenierungen verlaufen wahrscheinlich prinzipiell genau so wie die 11-Oxydation. Beide benötigen nach den neuesten Untersuchungen[11] ebenfalls molekularen Sauerstoff.

* Institut für Vegetative Physiologie der Universität, Frankfurt a. M.

[1] R. S. Mach, J. Fabre, A. Duckert, R. Barth und P. Ducommun, Schweiz. med. Wschr. *84*, 407 (1954). – Zusammenfassende Darstellung: J. J. Pfiffner, Advances in Enzymology *2*, 325 (1943). – T. Reichstein und C. W. Shoppee, Vitamins and Hormones *1*, 346 (1943). – E. C. Kendall, Proc. Staff. Meeting Mayo Clin. *12*, 136 (1937). – T. Reichstein, Erg. Vitamin-Hormonforsch. *1*, 334 (1938). T. Reichstein und J. v. Euw, Helv. chim. Acta *21*, 1197 (1938). – O. Wintersteiner und J. J. Pfiffner, J. biol. Chem. *116*, 291 (1936). – S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler und T. Reichstein, Helv. chim. Acta *37*, 1163 (1954).

[2] W. R. Slaunwhite, jr. und L. T. Samuels, J. biol. Chem. *220*, 341 (1956).

[3] G. Meyerheim und H. J. Hübener, Naturwissenschaften *39*, 482 (1952). – Hj. Staudinger und M. Schmeisser, Biochem. Z. *321*, 83 (1950).

[4] M. L. Sweat, J. Amer. chem. Soc. *73*, 4056 (1951).

[5] M. L. Sweat und M. D. Lipscomb, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5183 (1955). – J. K. Grant und A. C. Brownie, Biochim. biophys. Acta *18*, 433 (1955).

[6] M. Hayano, A. Saito, D. Stone und R. I. Dorfman, Biochim. biophys. Acta *21*, 380 (1956).

[7] H. S. Mason und I. Onoprienke, Fed. Proc. *15*, 310 (1956). – K. J. Ryan, Fed. Proc. *15*, 344 (1956). – W. S. Lynn und R. Brown, Biochim. biophys. Acta *21*, 403 (1956).

[8] C. Mitoma, Arch. Biochem. Biophys. *60*, 476 (1956).

[9] M. E. Sweat *et al.*, Fed. Proc. *15*, 1200 (1956).

[10] M. Hayano, M. C. Lindberg, R. J. Dorfman, J. E. H. Haucock und W. E. Doering, Arch. Biochem. Biophys. *59*, 529 (1955).

[11] G. Rosenfeld und W. D. Bascom, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *92*, 66 (1956).

Hormonsynthese in der Nebennierenrinde.

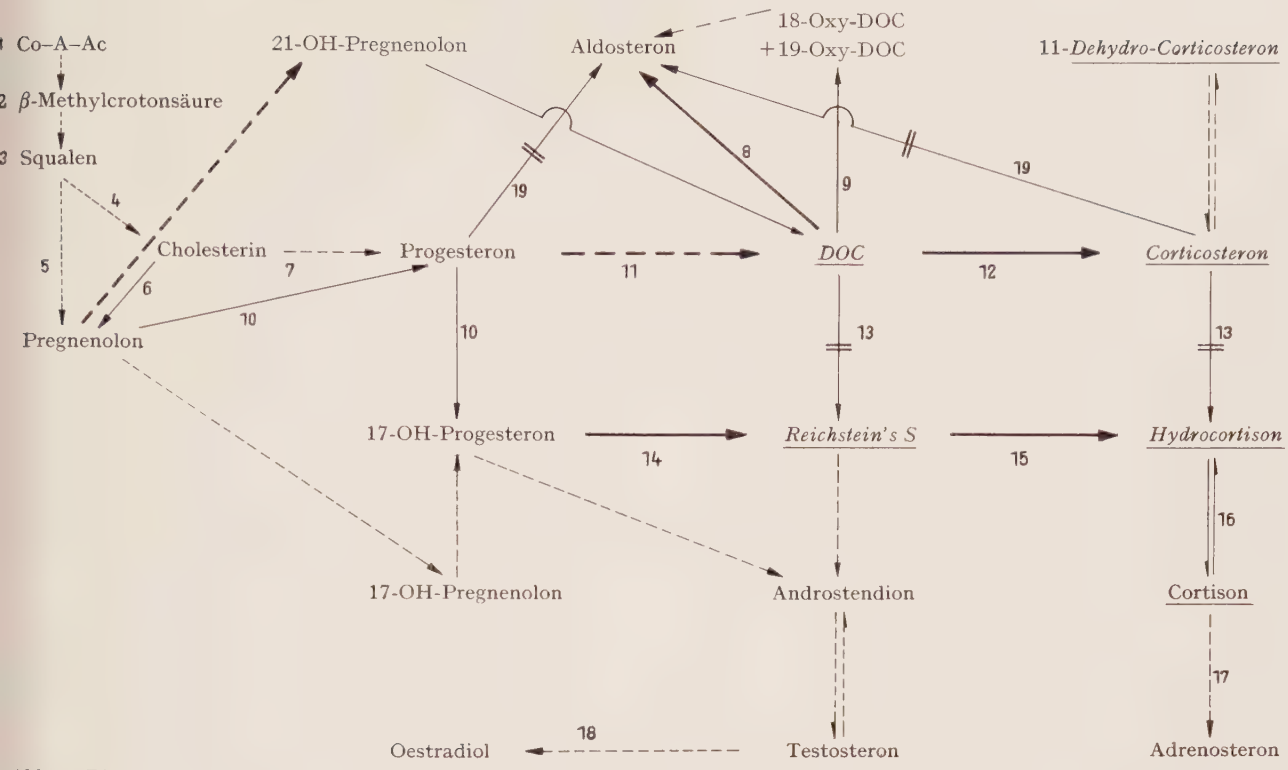


Abb. 1. Die ausgezogenen Pfeile stellen gesicherte, die gestrichelten wahrscheinliche Umwandlungen dar. Die fetten Pfeile geben NNR-spezifische Oxygenierungen an.

Literatur zu Figur 1 (die mit einem Stern gekennzeichneten Umwandlungen wurden in der Nebenniere selbst beobachtet):

[1] F. Lipmann, Science *120*, 855 (1954).

[2] J. Bonner, A. B. Arreguin, Arch. Biochem. *21*, 109 (1949). – K. Bloch, L. C. Cark und I. Harary, J. biol. Chem. *211*, 687 (1954).

[3] M. Tsujimoto, J. Ind. and Engin. Chem. *8*, 889 (1916). – J. M. Heilbron, E. D. Kamm und W. M. Owens, J. Amer. chem. Soc. *48*, 1630, 3131 (1926). – R. Robinson, J. Soc. chem. Ind. *52*, 1062 (1934). – R. G. Langdon, K. Bloch, J. biol. Chem. *200*, 129 (1953).

[4] R. G. Langdon und K. Bloch, J. biol. Chem. *200*, 135 (1953). – J. W. Cornforth, G. D. Hunter und G. Popjak, Arch. Biochem. Biophys. *42*, 181 (1953).

[5*] Ein direkter Weg vom Squalen zu den C_{21}-Steroiden ist deswegen wahrscheinlich, weil nach Gaben von radioaktivem Azetat die spezifische Aktivität der NNR-Hormone grösser ist als die des Cholesterins. O. Hechter, M. M. Solomon, A. Zaffaroni und G. Pincus, Arch. Biochem. Biophys. *46*, 201 (1953).

[6*] E. Staple, W. S. Lynn und S. Gurin, J. biol. Chem. *219*, 845 (1956).

[7] Nach Gaben von radioaktivem Cholesterin an schwangere Frauen wurde markiertes Pregnandiol gefunden, ein typisches Umwandlungsprodukt des Progesterons: K. Bloch, J. biol. Chem. *157*, 661 (1945).

[8*] F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Exper. *11*, 446 (1955).

[9] F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1237 (1955).

[10] H. Levy, R. W. Jeanloz, R. P. Jacobson, O. Hechter, V. Schenker und G. Pincus, J. biol. Chem. *211*, 867 (1954).

[11*] M. Hayano und R. I. Dorfman, Arch. Biochem. Biophys. *36*, 237 (1952).

[12*] O. Hechter, R. P. Jacobson, R. W. Jeanloz, H. Levy, C. W. Marshall, G. Pincus und V. Schenker, J. Amer. chem. Soc. *71*, 3261 (1949).

[13] O. Hechter, R. P. Jacobson, R. W. Jeanloz, H. Levy, G. Pincus und V. Schenker, J. clin. Endocrin. *10*, 827 (1950). – H. J. Hübner und D. Amelung, Hoppe Seylers Z. *293*, 126 (1953).

[14] J. E. Plager und L. T. Samuels, Arch. Biochem. Biophys. *42*, 477 (1953).

[15] O. Hechter, V. Schenker und G. Pincus, Abstr. 118th Meeting, Amer. chem. Soc. *29* C (1950). – O. Hechter, A. Zaffaroni, R. P. Jacobsen, H. Levy, R. M. Jeanloz, V. Schenker und G. Pincus, Rec. Prog. Hor. Res. *6*, 215 (1951) (Academic Press, N.Y.).

[16*] H. J. Hübener und D. Amelung, Hoppe Seylers Z. *293*, 126 (1953).

[17*] A. S. Meyer, J. biol. Chem. *203*, 469 (1953).

[18] I. T. Nathanson, L. L. Engel, B. J. Kennedy und R. M. Kelley, *Symposion on Steroids in experimental and clinical Practice* (Blakiston & Co., Philadelphia 1951). – B. Baggett, L. L. Engel, K. Savard und R. J. Dorfman, Fed. Proc. *14*, 175 (1955).

[19*] A. Wettstein, F. W. Kahnt und R. Neher, Ciba Found. Coll. Endocrin. *8*, 170 (1955).

Schliesslich sei noch ein Wort über die 11β-Oxydation in der Leber gesagt. Auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen[12] wurde von verschiedenen Autoren vermutet, dass die Leber Steroide am C-Atom 11 oxydieren könnte. Inzwischen wurden jedoch die vermeintlichen 11-Oxy-Steroide als 20-Oxy-Steroide auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens, des Schmelzpunktes und des Infrarotspektrums identifiziert[13]. Eine Oxydation von Steroiden am C-Atom-11 ist demnach in der Leber nicht möglich und wahrscheinlich nur der NNR vorbehalten.

[12] H. Senecca, E. Ellenbogen, H. Henderson, A. Collin und J. Rockenbach, Science *112*, 524 (1950). – F. W. Kahnt und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *34*, 1790 (1951). – D. Amelung, H. J. Hübener und L. Roka, Hoppe Seylers Z. *294*, 36 (1953). – R. Axelrod und L. L. Miller, Fed. Proc. *12*, 173 (1953).

[13] H. J. Hübener und J. Schmidt-Thomé, Hoppe Seylers Z. *299*, 240 (1955).

Folgende Abkürzungen wurden benutzt:
ATP für Adenosintriphosphat,
DPN für Diphosphopyridinnucleotid,
TPN für Triphosphopyridinnucleotid,
DPNH und TPNH für die hydrierten Kofaktoren;
DOC für Δ^4-Pregnen-ol-(21)-dion-(3,20) (11-Desoxycorticosteron);
Corticosteron für Δ^4-Pregnen-diol-(11β,21)-dion-(3,20);
Cortison für Δ^4-Pregnen-diol-(17α,21)-trion-(3,11,20);
Hydrocortison für Δ^4-Pregnen-triol-(11β,17α,21)-dion-(3,20);
Dihydrocortison für Pregnan-diol-(17α,21)-trion-(3,11,20);
Tetrahydrocortison für Pregnan-triol-(3α,17α,21)-trion-(11,20).

Die Oxydation der angulären Methylgruppe. Als weitere nebennierenrindenspezifische enzymatische Leistung sei die C_{18}-Oxydation kurz besprochen. Nach Arbeiten von Wettstein *et al.* ist wahrscheinlich, dass die C_{18}-Methylgruppe nur dann zum Aldehyd oxydiert werden kann, wenn am C-Atom-11 keine Hydroxylgruppe steht, da NNR-Homogenate nur DOC, nicht jedoch Corticosteron zu Aldosteron oxydierten[14]. Zu anderen Ergebnissen gelangten kürzlich Dorfman *et al.*[15] bei Durchströmungsexperimenten mit Kälbernebennieren. Bei diesen Untersuchungen wurde lediglich Progesteron, nicht dagegen DOC und Corticosteron in Aldosteron umgewandelt.

In diesem Zusammenhang scheint mir wichtig zu erwähnen, dass die Aldosteronbildung im Gegensatz zur Corticosteronsynthese ACTH-unabhängig ist[16]. Das ist schwer zu verstehen, da beide Hormone vom Progesteron abstammen und das ACTH jedenfalls nicht die 11β- und die 21-Oxydation verbessert. Beide Hormone werden nun in zwei verschiedenen Arealen der NNR gebildet[17]; vielleicht ist eines dieser Areale ACTH-unabhängig.

In letzter Zeit ist nun beschrieben worden, dass die NNR nicht nur die C-18-Methylgruppe, sondern auch diejenige des C-19 oxydieren kann[18]. Obgleich das Enzym, das die C-19-Methylgruppe oxydiert, wahrscheinlich nicht spezifisch für die NNR ist[19], möchte ich doch an dieser Stelle darauf eingehen, da die NNR durch diese Oxydation neutrale Steroide in Östrogene überführen kann. Dieser Weg ist im einzelnen in Abbildung 2 dargestellt.

Aus 19-Oxy-Androsten-dion konnten Ovarien und Plazenta Östron synthetisieren. Der erste Schritt hierbei dürfte die oxydative Decarboxylierung am C-Atom-10 sein. Danach ergeben sich zwei Wege; entweder es wird direkt eine Δ^{10-1}-Doppelbindung eingeführt, oder es entsteht bei der Decarboxylierung eine Hydroxylgruppe am C-Atom-10, die durch Wasserabspaltung in eine Doppelbindung übergeht. Mikroorganismen können übrigens eine 10-ξ-Hydroxylgruppe in 19-Nor-Testosteron einführen[20]. In beiden Fällen entsteht das gleiche Umwandlungsprodukt, ein $\Delta^{1-10,4}$-3-Keto-Östron-Derivat, das durch einfache Umlagerung in ein Östrogen übergeführt werden kann (Abb. 2). Beide Methylgruppen oxydierenden Fermente sind im Gesamthomogenat am aktivsten, sie werden jedoch auch im Überstand von 5000 g beobachtet[18].

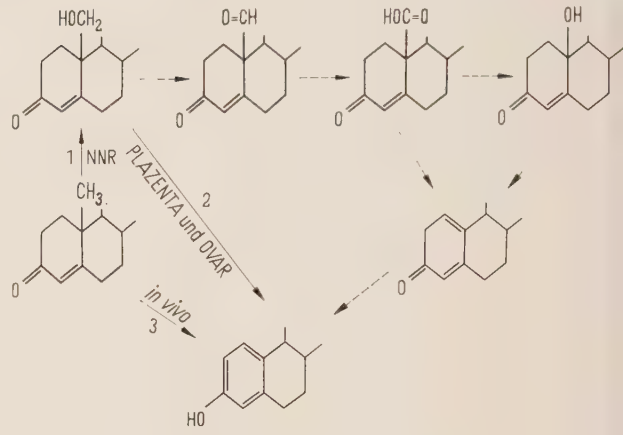


Abb. 2.

[1] A. S. Meyer, Exper. *11*, 99 (1955). – F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1237 (1955). – A. Zaffaroni, V. Troncoso und M. Garcia, Chem. Ind. *1955*, 534. – H. Levy, S. Kushusky, Arch. Biochem. Biophys. *55*, 290 (1955). – M. Hayano und R. J. Dorfman, Arch. Biochem. Biophys. *55*, 289 (1955).

[2] A. S. Meyer, Biochim. biophys. Acta *17*, 441 (1955).

[3] C. D. West, B. L. Damast, S. D. Sarro und O. H. Pearson J. biol. Chem. *218*, 409 (1956). – J. Nathanson *et al.*, zitiert nach R. J. Dorfman und F. Ungar, *Metabolism of Steroid Hormones* (Burgess Publ. Co.). – B. Baggett, L. L. Engel, K. Savard und R. J. Dorfman, Fed. Proc. *14*, 175 (1955). Der Weg 3 wurde soeben auch *in vitro* an menschlichen Ovarialschnitten demonstriert. B. Baggett L. L. Engel, K. Savard und R. I. Dorfman, J. biol. Chem. *221*, 931 (1956).

Die in Abbildung 3 dargestellte Umwandlung von Androgenen in Östrogene könnte vielleicht der Grund dafür sein, dass sich bei gonadektomierten Karzinompatientinnen mitunter eine Resistenz gegen Androgentherapie herausbildet, wenn nämlich diese Androgene zum Teil in der NNR in Östrogene umgewandelt werden. Vielleicht kann diese Umwandlung aber auch ausserhalb der steroidhormonproduzierenden Drüsen stattfinden[21].

Δ^4-3-keto-Steroid ges. 3-keto-Steroid 3α-hydroxy-Steroid

Abb. 3. Reduktion der Δ^4-3-on-Gruppe durch Enzyme aus dem Zytoplasma der Leberzelle.

Die 21-Hydroxylgruppe kann schliesslich (genau so übrigens die 17α-Hydroxylgruppe) durch das Zytoplasma und die Mikrosomen der NNR-Zelle in Gegen-

[14] F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Exper. *11*, 446 (1955).

[15] E. Rosemberg, G. Rosenfeld, F. Ungar und R. I. Dorfman, Endocrinol. *58*, 708 (1956).

[16] S. A. Simpson und J. F. Tait, Recent Progr. Hormone Res. *11*, 183 (1955). – E. H. Venning, B. Singer, A. Carballeira, J. Dyrenfurth, J. Beck und C. J. Giroud, Ciba Found. Coll. Endocrin. *8*, 190 (1955).

[17] P. J. Ayres, R. P. Gould, J. D. Simpson und J. F. Tait, Biochem. J. *63*, 190 (1956). – E. H. Vennig, C. J. Giroud, M. Saffran und A. V. Schally, Proc. Canad. Physiol. Soc., 90th meeting 1955; Conn; J. Lab. clin. Med. (im Druck).

[18] F. W. Kahnt, R. Neher und A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1237 (1955).

[19] R. D. H. Heard, Laurentian Hormone Conference, Estes Park Col. (1955).

[20] R. L. Pederson, J. A. Campbell, C. Babcock, S. H. Eppstein, H. C. Murray, A. Weintraub, R. C. Meecs, P. Meister L. M. Reinicke und D. H. Peterson, J. Amer. chem. Soc. *78*, 1515 (1956).

[21] C. D. West, B. L. Damast, S. D. Damast, S. D. Sarro und O. H. Pearson, J. biol. Chem. *218*, 409 (1956).

wart von TPN[22] (oder ATP, DPN und Nikotinsäureamid[23]) eingeführt werden.

Die der Biosynthese übergeordneten Proteohormone der Hypophyse zeigten sich in den hier besprochenen zellfreien Systemen unwirksam[24], sie werden daher in diesem Rahmen nicht besprochen.

Der extraadrenale Stoffwechsel der NNR-Hormone. Ich möchte im folgenden von der grossen Zahl der Veränderungen, die die NNR-Hormone ausserhalb der endokrinen Drüsen erleiden, nur vier herausgreifen; nämlich die Reduktion der 11-Keto-Gruppe, der 20-Keto-Gruppe und der Δ^4-3-on-Gruppe sowie die Konjugation der NNR-Hormone mit Glucuronsäure (vgl. Tab.). Ausser der letztgenannten Konjugation handelt es sich also ausschliesslich um reduktive Veränderungen der NNR-Hormone. Diese vier extraglandulären Hormonumwandlungen übertreffen quantitativ bei weitem alle übrigen. Sie lassen sich mit Leberhomogenaten im Reagenzglas mit einer Ausbeute von 50 bis 100% durchführen, und *in vivo* laufen sie praktisch quantitativ ab.

Demgegenüber verlaufen alle übrigen extraglandulären Steroidumwandlungen *in vivo* und *in vitro* mit viel geringerer Ausbeute, meist weniger als 1%; so zum Beispiel die 2α-[25], die 2β-[26] und die 16α-Oxygenierung[27] sowie die Umwandlung von 21-Oxy-Steroiden in 21-Methyl-Steroide. Die Umwandlungsprodukte dieser Reaktionen sind, soweit dies bisher geprüft wurde, biologisch inaktiv. Man kann sie daher wohl als Nebenreaktionen betrachten.

Die Berichte über die enzymatische *in vitro*-Abspaltung der Seitenkette von NNR-Hormonen ausserhalb der endokrinen Drüsen sind bisher nicht überzeugend, da die Ausbeute hierbei immer kleiner war als 1% und diese geringe Menge auch leicht als Kunstprodukt zum Beispiel durch Peroxyde im Äther oder Adsorbentien entstehen kann. Wir konnten die Abspaltung in Leberhomogenaten nicht beobachten[28]. *In vivo* läuft sie dagegen mit grösserer Ausbeute ab. So konnten Staudinger *et al.*[29] an gonadektomierten und adrenalektomierten Frauen eine Umwandlung von Cortison in 17-keto-Steroide sicher nachweisen. Immerhin scheint uns noch möglich, dass ein Teil dieser 17-keto-Steroide als Artefakt an der Aluminiumoxydsäule entstehen.

Enzyme, die die 11- und 20-keto-Gruppe reduzieren. Besprechen wir nun die vier oben erwähnten Hauptreaktionen, und beginnen wir mit den von uns im hiesigen Institut untersuchten Enzymen, die die NNR-Hormone am C-Atom-11 und -20 reduzieren[30]. Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind Dehydrogenasen, die folgende Reaktion vermitteln:

$$\text{Steroid-Alkohol} + \text{Akzeptor} \rightleftharpoons \text{keto-Steroid} + \text{hydrierter Akzeptor}$$

Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist, wie bei den meisten Dehydrogenasen, weit nach der alkoholischen Seite hin verschoben. Um möglichst grosse enzymatische Umwandlungen beobachten zu können, haben wir daher die Reaktionen von rechts nach links verfolgt; das heisst, wir haben keto-Steroide eingesetzt und anschliessend analysiert, wieviel von dem keto-Steroid in das entsprechende alkoholische Steroid umgewandelt wurde.

Die Enzyme, die die 11- und 20-keto-Gruppe von Steroiden reduzieren, weisen auffallend ähnliche Eigenschaften auf. Beide Dehydrogenasen sind in den Mikrosomen der Leber lokalisiert und können mit sehr geringen Mengen *p*-Chlormercuribenzoat (10^{-4} m) vergiftet werden. Glutathion und Zystein verhindern die Vergiftung, was dafür spricht, dass freie Sulfhydrylgruppen des Enzyms bei der Umwandlung beteiligt sind. Die bekannten Kofaktoren für Dehydrogenasen, die Pyridinnukleotide und die Zytochrome konnten wir für unsere Enzyme ausschliessen.

Kürzlich wurde von Recknagel *et al.*[31] sowie von de Curcy *et al.*[32] mit einer indirekten Methode unsere frühere Beobachtung[33] bestätigt, dass die Enzymsysteme, die die 20-keto-Gruppe reduzieren, in den Mikrosomen der Leberzelle lokalisiert sind. Im Gegensatz zu uns vermuten diese Autoren, dass TPNH[31] beziehungsweise DPNH und TPNH[32] Kofaktoren der 20-keto-Reduktion sind; diese Angaben sind aber aus methodischen Gründen nicht gesichert. Unseren Befunden entsprechen auch die Beobachtungen von Eisenstein[34] und Caspi *et al.*[35]», nach denen DPNH und TPNH praktisch unwirksam bei der Reduktion der Seitenkette sind.

Beide Enzyme zeigten auffallende Substratspezifität. So wurde die 11-keto-Gruppe nur von den Steroiden reduziert, die die Δ^4-3-on-Gruppe besitzen[36], nicht dagegen von im *A*-Ring gesättigten Steroiden[37]. Es ist daher wahrscheinlich, dass das Steroid erst mit der Δ^4-3-on-Gruppe an die besprochene Dehydrogenase gebunden wird, bevor es in 11-Stellung reduziert werden kann. Bei der enzymatischen 20-keto-Reduktion andererseits beeinflusst die Substitution am C-Atom-11 den sterischen Verlauf der Umwandlung: 11β-Oxy-Steroide werden nämlich zu 20β-, 11-desoxy- und 11-keto-Steroide zu 20α-Derivaten reduziert[37] (Tabelle 1). Es sind daher wahrscheinlich zwei Gruppen von Enzymen in den

[22] R. I. Dorfman, M. Hayano, R. Haynes und K. Savard, Ciba Found. Coll. Endocrin. *7*, 191 (1953). – J. R. Kenneth und L. L. Engel, J. Amer. chem. Soc. *78*, 2654 (1956).

[23] J. E. Plager und L. T. Samuels, Fed. Proc. *11*, 383 (1952). – K. J. Ryon, Fed. Proc. *15*, Ref. Nr. 1125 (1956).

[24] M. Saffran und M. J. Bayliss, Endocrinol. *52*, 140 (1953). – F. G. Hoffmann und C. Davidson, Endocrinol. *54*, 580 (1954). – H. J. Hübener und D. Amelung, Hoppe Seylers Z. *293*, 126 (1953).

[25] S. Burstein, J. Amer. chem. Soc. *78*, 1769 (1956).

[26] L. R. Axelrod, L. L. Miller und F. Herling, J. biol. Chem. *219*, 455 (1956).

[27] J. J. Schneider und H. L. Mason, J. biol. Chem. *172*, 771 (1948).

[28] K. W. Brückel, H. J. Hübener, G. Meyerheim und G. Liersch, Klin. Wschr. *32*, 21 (1954).

[29] Hj. Staudinger, M. Taugner und W. Weiss, Klin. Wschr. *32*, 1082 (1954).

[30] H. J. Hübener und D. Amelung, Hoppe Seylers Z. *293*, 126 (1953). – H. J. Hübener und J. Schmidt-Thomé, Hoppe Seylers Z. *299*, 240 (1955).

[31] R. O. Recknagel und E. M. Glenn, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *89*, 156 (1955).

[32] C. de Courcy und J. J. Schneider, J. biol. Chem. *223*, 865 (1956).

[33] H. J. Hübener, *V. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, April 1954* (Springer-Verlag, Heidelberg). – H. J. Hübener und D. Amelung, Z. physiol. Chem. *293*, 126 (1933). – H. J. Hübener, Z. physiol. Chem. *298*, 283 (1954).

[34] A. B. Eisenstein, J. biol. Chem. *215*, 585 (1955).

[35] E. Caspi, M. C. Lindberg, M. Hayano, J. L. Cohen, M. Matsuba, H. Rosenkrantz und R. I. Dorfman, Arch. Biochem. Biophys. *61*, 267 (1956).

[36] H. J. Hübener und D. Amelung, Hoppe Seylers Z. *293*, 126 (1953). – C. A. Fish, M. Hayano und G. Pincus, Arch. Biochem. Biophys. *42*, 480 (1953). – A. B. Eisenstein, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *83*, 27 (1953).

[37] H. J. Hübener, D. F. Fukushima und T. G. Gallagher, J. biol. Chem. *220*, 499 (1956).

Hauptreaktionen des Steroid-Stoffwechsels ausserhalb der endokrinen Drüsen

Enzym Reaktion	Name des Enzyms	Reinste Enzym-aufarbeitung	Kofaktor	MK	Untersuchte Steroide	Substrat-Spezifität	Lit.
11-Keto-Reduktion (reversibel)	11β-Oxy-Dehydrogenase	Mikrosomen der Leber	unbekannt*	$2 \cdot 10^{-5}$	Kendalls, E. u. A. Reichsteins U. 11-Keto-Progesteron Andrenosteron	spezifisch für Δ^4-3-Keto-Steroide	1
20-Keto-Reduktion der Dioxyazeton-Seitenkette (irreversibel)	20-Keto-Hydrogenase	Mikrosomen der Leber	unbekannt*	$5 \cdot 10^{-5}$	Reichsteins S $\rightarrow 20\alpha$ Tetrahydro E $\longrightarrow 20\alpha$ Tetrahydro F $\longrightarrow 20\beta$ Kendalls F $\longrightarrow 20\beta$	11-Oxy-Steroide $\longrightarrow 20\beta$ 11-Keto und 11-Desoxy-Steroide $\longrightarrow 20\alpha$	1
Δ^4-Reduktion von Δ^4-3-Keto-Steroiden (irreversibel)	Δ^4-Hydrogenase	Ammoniumsulfat-Präzipitat der Leber-Proteinfraktion (55–70%)	TPNH		Cortison zu Dihydro-Cortison	grosse Substrat-Spezifität	2
3-Keto-Reduktion (reversibel)	3α-Oxy-Dehydrogenase	Ammoniumsulfat-Präzipitat der Leber-Proteinfraktion (55–70%), anschliessend Äthanol-Fällung (20–30 Vol%), 100fache Anreicherung; das Enzym kommt auch in der Niere und den Testes vor	DPNH und TPNH	10^{-5}	Dihydrocortison, Pregnan-triol-(11β, 17α,21)-dion-(3,20) Ätiocholon-dion-(3,17) Androstan-dion-(3,17) Androstan-ol-(17β)-on(3)	Steroide mit Iso-octylseitenkette sowie α-β-ungesättigte 3-Keto-Steroide werden nicht umgesetzt	2
Glucuronid-Bildung	Steroid-Glycosidase	Mikrosomen	Uridin-Diphosphat		Tetrahydro-Cortison	3α-Glucuronid von Tetrahydro-Cortison	3

[1] H. J. Hübener, D. K. Fukushima und T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *220*, 499 (1956). – H. J. Hübener, V. Coll. Mosbach (Springer, Berlin 1954).
[2] G. M. Tomkins, J. biol. Chem. *218*, 437 (1956); *Laurentian Hormone Conference* (Estes Park, Col. 1956).
[3] K. J. Isselbacher und J. Axelrod, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1070 (1955).
* Wahrscheinlich ein Flavin (H. J. Hübener, unveröffentlicht).

Mikrosomen vorhanden, die die 20-keto-Gruppe reduzieren. Die eine Gruppe setzt vorwiegend 11β-oxy-, die andere 11-desoxy- und 11-keto-Steroide um.

In letzter Zeit wurde erwogen[38], ob die Oxydoreduktion am C-Atom-11 mit dem Wirkungsmechanismus der 11-oxygenierten NNR-Hormone verknüpft sei. Obgleich dies bei dem heutigen Stand des Wissens[38] nicht sicher ausgeschlossen werden kann, spricht doch dagegen, dass im Überlebenstest unwirksame 11-Oxy-Steroide auch an 11-Stellung zum Teil reversibel oxydiert und reduziert werden können, zum Beispiel:

Δ^4-Pregnen-triol-(17α, 20β,21)-dion-(11,13) $\rightleftharpoons$ Δ^4-Pregnen-tetrol-(11β,17α,20β,21)-on-(3) [37]

und

Δ^4-Androsten-trion-(3,11,17) $\longrightarrow$ Δ^4-Androsten-ol-(11β)-dion-(3,17)[39]

Die Suche nach Kofaktoren der 11- und 20-keto-Reduktion wird dadurch erschwert, dass diese Enzyme in den Mikrosomen ausserordentlich labil sind. Sedimentieren und Rehomogenisieren der Mikrosomen, sowie Austauschchromatographie des Enzymsystems an Dowex I zerstört den grössten Teil der Aktivität, auch wenn man danach wieder das Zytoplasma oder Kochsaft zusetzt. Es handelt sich also um eine mechanische Zerstörung und nicht um das Auswaschen oder Adsorbieren eines Kofaktors.

Um einfachere Enzymmodelle für diese Umwandlungen zu finden, haben wir gemeinsam mit Herrn Professor Schmidt-Thomé die 20-keto-Reduktion durch Enzyme von Mikroorganismen[40] untersucht. Diese Enzyme verhielten sich jedoch in allem gegensätzlich zu den entsprechenden Säugetierenzymen. Sie sind pyridinnukleotidabhängig und zwar in gleichem Masse von DPNH und TPNH, sie reduzieren 20-keto-Steroide ausschliesslich zu 20β-Derivaten und sind im Zytoplasma lokalisiert, also nicht strukturgebunden. Steroidumwandelnde Enzyme von Mikroorganismen eignen sich also nicht als Modelle der entsprechenden Säugetierenzyme. Dies steht zum Beispiel im Gegensatz zu den Enzymen der Gly-

[38] J. E. Bush, Exper. *12*, 325 (1956).
[39] H. J. Hübener, Hoppe Seylers Z. *298*, 283 (1954).
[40] S. A. Szpilfogel, M. S. de Winter und W. Y. Alsche, Rec. trav. chim. *75*, 402 (1956). – A. Wettstein, Exper. *11*, 465 (1955).

kolyse. Wahrscheinlich deshalb, weil die NNR-Hormone keine physiologischen Bestandteile der Mikroorganismen sind und es daher dem Zufall überlassen bleibt, wie diese Hormone von den Mikroorganismen durch adaptive Enzymbildung umgesetzt werden.

Die Reduktion der Δ^4-3-on-Gruppe. Wenden wir uns nun der Reduktion der Δ^4-3-on-Gruppe zu. Sie verläuft in zwei Schritten[41] (Abb. 3).

Der erste Schritt der Reduktion ist die Hydrierung der Doppelbindung. Das Enzym hierfür ist im Zytoplasma der Leberzelle lokalisiert. Es lässt sich zwischen 55 und 70% Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällen und ist TPNH-abhängig[41]. Die Reaktion ist irreversibel. Bei dem zweiten Schritt sind DPNH und TPNH gleich wirksam. Ferner ist dieser Schritt im Gegensatz zum ersten reversibel, das heisst 3α-Oxy-Steroide können durch die Leber zu 3-keto-Steroiden reduziert werden. Das Enzym, die 3α-Oxy-Dehydrogenase weist keine strenge Substratspezifität auf[42]. Die meisten untersuchten 3-keto-Steroide wurden von ihm reduziert, lediglich Steroide mit konjugierter Doppelbindung (Cortison oder Hydrocortison) und Steroide mit Iso-Octylseitenkette (Cholestanon und Coprostanon) werden von dem Enzym nicht umgesetzt. Da die eben besprochene Δ^4-Dehydrogenase jedoch nur 5βH-Derivate bildet, bleibt noch ungeklärt, wie die aus dem Harn isolierten 5α H-Derivate aus Δ^4-Steroiden entstehen.

Die Glucuronidbildung. Als letzte der extraadrenalen Umwandlungen möchte ich noch die Glucuronidbildung von NNR-Hormonen in der Leber besprechen. Die Leber verknüpft fast ausschliesslich nur 3-oxy-Steroide mit Glucuronsäure. Das bedeutet, dass die NNR-Hormone schon durch das zuletzt besprochene Enzymsystem im *A*-Ring reduziert sein müssen, bevor sie in ein Glucuronidderivat überführt werden. Das konjugierende Enzym ist genau so wie die Enzyme, die die 11-keto- und 20-keto-Gruppe reduzieren, in den Mikrosomen lokalisiert[43]. Der Kofaktor für diese Konjugation ist Uridindiphosphat (UDP), das an seiner freien Phosphorgruppe mit Glucuronsäure verknüpft ist. Das Enzym überträgt nun die Glucuronsäure von dem Kofaktor auf das 3-oxy-Steroid. Hierbei hebt das Uridindiphosphat die Glucuronsäure auf ein höheres Energieniveau, ähnlich wie das ATP die Phosphorsäure.

$$\text{UDPGS} + \text{Tetrahydrocortison} \xrightarrow{\text{Mikrosomen}} \text{Tetrahydrocortisonglucuronid} + \text{UDP}$$

Von den gleichen Autoren, die diese Reaktion entdeckten[43], wurde auch gezeigt, dass dieses Enzymsystem auch Phenolphthalein und Thyroxin in die entsprechenden Glucuronide überführt.

Über die biologische Aktivität. Wie steht es nun mit der biologischen Aktivität der extraadrenalen Umwandlungsprodukte? Beginnen wir wieder bei der enzymatischen 11-keto-Reduktion. Cortison wird in der Leber zu Hydrocortison reduziert, das im Muskeltest und im Glykogenspeicherungstest dem Cortison etwas überlegen ist und intraartikulär injiziert, im Gegensatz zum Cortison, entzündungshemmend wirkt[44]. Hier liegt also eine Aktivierung des Hormons durch die Leber vor. Wie wir an den folgenden Beispielen sehen werden, handelt es sich hierbei jedoch um eine Ausnahme. Die 20-keto-Reduktion von NNR-Hormonen führt, wie oben erwähnt, zu 20α- und 20β-oxy-Derivaten in der Leber. Diese 20-oxy-Steroide können adrenalektomierte Tiere nicht am Leben erhalten. Das 20β-oxy-Derivat von Hydrocortison, Reichsteins Substanz E, behält jedoch etwas von seiner glykogenspeichernden Wirkung[45]. Wieweit dies auch für andere 20-oxy-Derivate zutrifft, ist meines Wissens noch nicht untersucht. Auch die Reduktion der Δ^4-3-on-Gruppe von NNR-Hormonen führt zum Verlust der lebenserhaltenden und glykogenspeichernden Wirkung. Nur bei den 3α-Allopregnan-Derivaten von Cortison und Hydrocortison bleibt ein Teil der Mineralstoffwechselwirkung zurück[46]. Es ist durchaus denkbar, dass die Mineralstoffwechselwirkung einiger NNR-Hormone ein Attribut ihrer enzymatischen Reduktion in der Leber ist. Die in letzter Zeit mikrobiologisch synthetisierten $\Delta^{1,4}$-NNR-Hormone können wahrscheinlich nicht von der Leber am *A*-Ring reduziert werden[47] und haben vielleicht deswegen geringere Mineralstoffwechselwirkung. Die Glucuronidderivate von NNR-Steroiden sind vollständig inaktiv, soweit dies bisher geprüft wurde. Die Konjugation findet wahrscheinlich statt, um die Steroide harnfähig zu machen. Durch drei dieser vier Hauptreaktionen verlieren die NNR-Hormone also ihre wesentlichste, nämlich ihre lebenserhaltende Wirkung.

Um einen Anhalt dafür zu bekommen, in welchem Ausmass diese Umwandlungen in der Leber ablaufen, wollen wir folgenden Überschlag anstellen: innerhalb einer halben Stunde werden nach unseren Untersuchungen von 200 mg Rattenleberhomogenat etwa 10–20 γ Reichsteins Substanz S in 20-Stellung reduziert. Wenn sich diese Experimente auf den Menschen übertragen lassen, so würde die 1400 g schwere Leber eines Erwachsenen 70–140 mg Steroid in dieser Zeit am C-Atom-20 reduzieren. Das Zytoplasma einer entsprechenden Lebermenge der Ratte reduziert in Gegenwart von TPNH und Nikotinsäureamid etwa 50–100 γ Cortison zu Tetrahydrocortison im gleichen Zeitraum. Auf den Menschen übertragen, entspräche das 350–700 mg Cortison, die in dieser Zeit durch Reduktion des *A*-Ringes inaktiviert werden. Auch bei Durchströmungsversuchen inaktivierte die Rattenleber NNR-Hormone sehr rasch[48]. Bei einem Durchlauf wurden etwa 11 mg Hydrocortison inaktiviert. Auf die menschliche Leber übertragen, entspräche das etwa 1,5 g Hydrocortison, die bereits beim ersten Durchlauf inaktiv werden können. Der Überschlag lässt schon erkennen, dass wahrscheinlich nach peroraler Gabe von klinisch üblichen Dosen, zum Beispiel 200 mg Cortison, der überwiegende Teil des Hormons innerhalb kürzester Zeit von der Leber inaktiviert wird. Experimente am Hund bestätigen dies. Nach oraler Gabe von radioaktivem Cortison wurden nämlich weniger als 4% des verabreichten Cortisons in der *Vena hepatica* als Cortison oder Hydrocortison wiedergefunden[49]. Dabei ist sicher, dass

[41] G. Tomkins und K. J. Isselbacher, J. Amer. chem. Soc. *76*, 3100 (1954).

[42] G. Tomkins, J. biol. Chem. *218*, 437 (1956).

[43] K. J. Isselbacher und J. Axelrod, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1070 (1955).

[44] J. L. Hollander, E. M. Brown jr. und R. A. Jsser, J. Amer. med. Assoc. *147*, 1629 (1951).

[45] D. Abelson, F. Ulrich und C. N. H. Long, Proc. Soc. exp. Biol. med. *89*, 386 (1955).

[46] E. Caspi, H. Levy und O. Hechter, Arch. Biochem. Biophys. *45*, 169 (1953).

[47] G. H. Gray und M. A. S. Green, Lancet *1955*, 1067. – R. S. Ely, A. K. Done und V. C. Kelley, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *91*, 503 (1956).

[48] E. Caspi und O. Hechter, Arch. Biochem. Biophys. *61*, 299 (1956).

[49] O. Hechter, Vitamins and Hormones *13*, 318 (1955).

die Steroidhormone nicht über den *Ductus lymphaticus* direkt in den grossen Kreislauf gelangen[50].

Über den Wirkungsort. Das Schicksal, von der Leber inaktiviert zu werden, teilen die NNR-Hormone also mit den anderen Steroidhormonen. Überraschend ist nun, dass die NNR-Hormone (im Gegensatz zu den Östrogenen, den Androgenen und dem Progesteron) trotz dieser fast vollständigen Inaktivierung durch die Leber peroral, das heisst nach Leberpassage, gut wirksam sind und zwar fast genau so wirksam wie intramuskulär appliziert. Um diesen Widerspruch zu erklären, diskutiert Hechter[49], dass die NNR-Hormone erst in der Leber zu den eigentlich aktiven Wirkstoffen umgewandelt werden könnten, ähnlich wie zum Beispiel unter geeigneten Bedingungen Pepsinogen in Pepsin, Trypsinogen in Trypsin oder Prothrombin in Thrombin verwandelt werden. Auf Grund der besprochenen Untersuchungen stehen jedoch in der Leber die enzymatischen Umwandlungen im Vordergrund, die NNR-Hormone inaktivieren. Da die NNR-Hormone trotzdem peroral ausgezeichnet wirksam sind, müssen sie daher schon in der Leber einen wesentlichen Teil ihrer Wirkung entfaltet haben, bevor sie dort inaktiviert werden. Die bekannten Wirkungen in der Peripherie könnten zum grossen Teil durch die Leber vermittelt sein.

Es liegt meines Erachtens kein Widerspruch darin, dass die NNR-Hormone am Ort ihrer Wirkung auch inaktiviert werden, ist doch die Inaktivierung eine wesentliche Voraussetzung ihrer regulativen Leistung.

Diese Untersuchungen geben also einen Anhalt dafür, dass die Leber ein wesentlicher Wirkungsort der NNR-Hormone ist und die Leber somit ein lohnendes Objekt zum Studium des Wirkungsmechanismus der NNR-Hormone sein dürfte.

Herrn Professor Felix danke ich für Gewährung eines Arbeitsplatzes und wertvolle Ratschläge und Herrn Professor Schmidt-Thomé für zahlreiche Literaturhinweise.

Summary

Three reactions, the 11β- and the 21-hydroxylation as well as the oxydation of the angular carbon 18, are specific for the adrenals. All other enzymatic steps in the biosynthesis of steroidhormones have been demonstrated in some other tissues also. Cofactors for the hydroxylation of steroids are reduced pyridinenucleotides. They seem to be necessary to activate molecular oxygen.

The extra-adrenal metabolism of adrenal hormones occurs mainly in the liver. Four principal reactions are known: the reduction of the Δ^4-3-on-, the 11-keto-, and the 20-keto-group as well as the conjugation of steroids with glucuronid acid. Evidence is given that the liver is the main target of corticosteroid action.

[50] E. H. Kass, O. Hechter, E. Caspi und R. Aycock, J. clin. Endocrin. Metab. *15*, 167 (1955).

CONGRESSUS

BRASIL

International Symposium on Curare and Curare-like Agents

Rio de Janeiro (Brasil)

5–7 August, 1957

Sponsored by the President of the United States of Brasil, organised under the Auspicies of Unesco the Conselho Nacional de Pesquisas, the Academia Brasileira de Sciencias and the Universidade do Brasil, a Symposium on Curare and Curare-like substances in the following problems is going to take place. The ethnographical problems concerning South-American Curare, the botanical origin of the active principle of Curare, the chemistry of Curare-like alkaloids, synthetic Curare, the physiology of the neuromuscular transmission and the mechanism of curarisation, pharmacological properties, the clinic of Curare.

The lectures will be held in the first week of August from 5th to 10th. Official languages are Portuguese, next Spanish, French, and English.

Correspondence for Brasil should be sent to Prof. C. Chagas, Instituto de Biofisica, Universidade do Brasil, 458 Avenida Pasteur, Rio de Janeiro; for Europe, to Prof. D. Bovet, Istituto Superiore di Sanità, 299 Viale Regina Elena, Rome, and to Prof. P. B. Carneiro, Délégation du Brésil, Unesco, 19, Av. Kléber, Paris (XVI^e).

CONGRESSUS

GREAT BRITAIN

XVth International Congress of Zoology

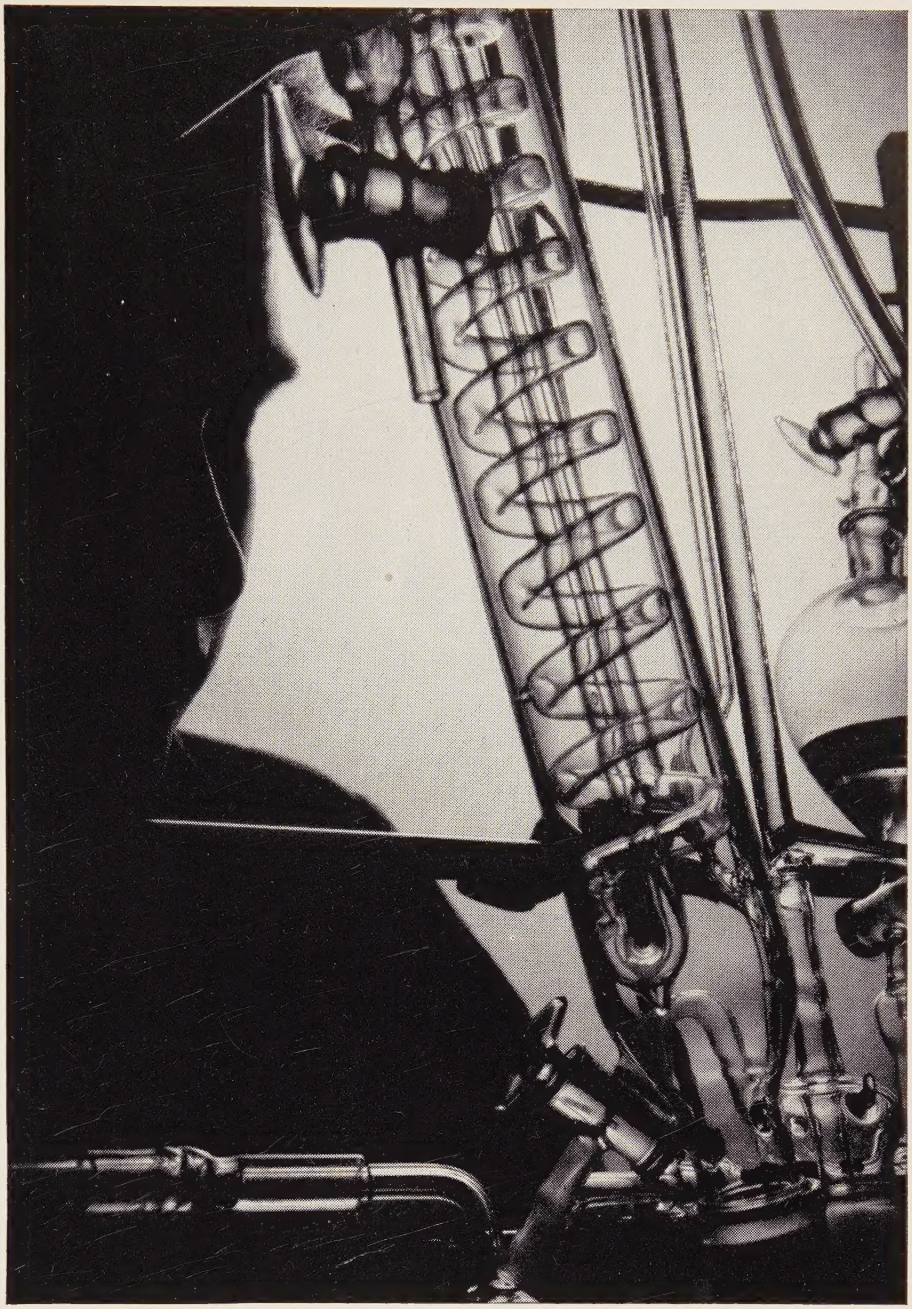
London 16th to 23rd July, 1958

The XVth International Congress of Zoology will take place in London from 16th to 23rd July, 1958, under the Presidency of Sir Gavin de Beer, F.R.S., Director of the British Museum (Natural History).

If you have not received the preliminary invitation, please inform the Registrar of the Congress: c/o British Museum (Natural History), London, S.W.7, England.

H. R. Hewer

Secretary-General



S A N D O Z - Präparate

basieren auf eigenen chemischen

und pharmakologischen Forschungen

sowie weltweiter klinischer

Erfahrung.

SANDOZ

Clichés Schwitter AG

Basel
Allschwilerstrasse 90
Telefon 061 38 88 50

Zürich
Stauffacherstrasse 45
Telefon 051 25 67 35